

Ensayos en invernadero y campo

*APLICACIÓN DE MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS Y
BIOLÓGICOS EN SUELOS CONTAMINADOS CON
CADMIO Y PLOMO*

Liliana Vega-Jara

Ensayos en invernadero y campo

*APLICACIÓN DE MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS Y
BIOLÓGICOS EN SUELOS CONTAMINADOS CON
CADMIO Y PLOMO*

Liliana Vega-Jara

Aplicación de métodos físico-químicos y biológicos en suelos contaminados con Cadmio y Plomo

Autora

© Liliana Vega-Jara

Primera Edición Digital: marzo, 2021

Publicación disponible en: <https://www.unheval.edu.pe>

Hecho el Depósito Legal en Biblioteca Nacional del Perú N° 2021-02974

Editado por:

Liliana Vega-Jara

Calle Huallaga N° 240, Urbanización La Quinta, Huánuco, Perú

E-mail: lvega@unheval.edu.pe

Derechos reservados. Prohibida la reproducción parcial o total de este Libro Virtual por cualquier medio sin autorización expresa de la autora.

ISBN: 978-612-00-6133-6



Agradecimientos

A las instituciones por su valiosa colaboración, Universidad Autónoma de Madrid, España por abrirme sus puertas para realizar estos ensayos en el laboratorio del Departamento de Química Agrícola y Alimentaria; a la UNHEVAL por financiar parte de estos experimentos y; al PNIA (Programa Nacional de Innovación Agraria) por financiar mi estancia en España.

Al voluntario olvidado...

Dedicatoria

Con todo mi amor a mi Danielita, mi bendición más grande, con quien ya planeo mil aventuras.

La autora

Prólogo

Perú, es uno de los países con amplia variedad de climas y suelos apropiados para realizar cultivos agrícolas, muchos de ellos son de exportación, tales como el cacao y pimiento. Sin embargo, por causas naturales y antrópicas, la calidad de los cultivos están sujetos con frecuencia a altas concentraciones de Cadmio y Plomo en los órganos cosechables (granos y frutos). Si bien, se han realizado importantes esfuerzos por solucionar los problemas de contaminación con metales pesados en suelos, las altas concentraciones de estos elementos en los órganos cosechables ocurren a menudo, principalmente en cultivos de cacao y, como consecuencia pérdidas económicas por reducciones en las exportaciones de estos productos a Europa, ya que ha entrado en vigencia el reglamento 488/2014 UE que establece límites máximos permisibles de contenido de Cadmio en granos y subproductos de cacao, el cual es más exigente.

La presencia de metales pesados en suelos agrícolas, generalmente afectan a la calidad de los órganos cosechables, dependiendo de la variedad, el cultivo puede ser mayor o menor acumulador de metales pesados. La presencia de estos elementos en los frutos puede ocasionar una serie de trastornos en la salud de las personas si los consumen por encima del valor límite tolerable, tales síntomas pueden ser gastrointestinales, fiebre, neumonitis química, anemia, falla hepática, insuficiencia respiratoria, entre otros o producir daños a las plantas y animales que se albergan dentro o sobre el suelo e, inclusive a sus consumidores o depredadores.

La remediación de suelos contaminados es una estrategia para enfrentar esta problemática, también se hace necesario usar distintos métodos ya sea para inmovilizar el Cd y Pb disponible en el suelo o eliminar este elemento del agrosistema usando plantas bioacumuladoras, de tal manera reducir su concentración en el órgano cosechable del cultivo. Los métodos físico-químicos y biológicos son herramientas que permiten reducir los altos contenidos de metales pesados en el follaje y fruto de las plantas. Este libro busca brindar algunos antecedentes de experiencias con el uso de varias alternativas, a los investigadores, profesionales y estudiantes involucrados en estas tareas, se detallan procedimientos para intentar aliviar este problema.

El libro está integrado por tres capítulos en los que se describen detalladamente los procedimientos de inmovilización de Cadmio y Plomo en suelos representativos de la selva de Huánuco, con altos niveles de contaminación. Estos experimentos y sus resultados se detallan paso a paso, incluyendo antecedentes de experiencias en otros contextos agrícolas con similares problemas a los suelos de Huánuco. En este libro se reúnen las experiencias de la autora con dos cultivos de exportación, importantes en el país, tras realizar dos ensayos y aplicar algunos métodos físico-químicos (biochar, humato, disolución nutritiva) y biológicos (comelina, hongos que causan micorrizas) enfocados a reducir la concentración de metales pesados en los órganos cosechables de los cultivos de pimiento y cacao, en condiciones de suelos contaminados con Cadmio y Plomo.

Índice

INTRODUCCIÓN	8
CAPÍTULO 1	
Problema de contaminación de cultivos con metales pesados	9
CAPÍTULO 2	
Antecedentes y bases teóricas	12
2.1. Antecedentes	12
2.2. Bases teóricas	14
2.3. Bases conceptuales	20
2.4. Bases epistemológicas o bases filosóficas o bases antropológicas	20
CAPÍTULO 3	
Experiencias de manejo de metales pesados en invernadero y campo	23
3.1. Ámbito, población, muestra y diseño experimental	23
3.2. Nivel y tipo de estudio	24
3.3. Procedimientos	24
3.3.1. Procedimiento en la fase de invernadero	24
3.3.2. Procedimiento en la fase de campo	28
3.3.3. Tratamientos en estudio	31
3.4. Tabulación	32
3.5. Análisis de datos	32
3.6. Análisis descriptivo de los resultados	32
3.7. Análisis inferencial de resultados y contrastación de hipótesis	34
3.7.1. Resultados de la fase de invernadero	34
3.7.2. Resultados de la fase de campo	42
3.8. Discusión de resultados	44
3.8.1. Fase de invernadero	44
3.8.2. Fase de campo	49
3.9. Aporte de la investigación	52
Consideraciones finales	54
Bibliografía	55

INTRODUCCIÓN

En los últimos años el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) ha tenido un crecimiento significativo debido a la alta demanda de este producto en América Latina. Las regiones con mayor producción de cacao son Amazonas, Cajamarca, San Martín y Huánuco, sin embargo el contenido de metales pesados (*i. e.* Cd) en los granos de cacao es un problema que ha provocado disminuciones en las exportaciones. Para que estos elementos sean absorbidos por las plantas existen varios factores que los hacen disponibles, como las características del suelo que tienden a reducir o aumentar su disponibilidad, ya que la movilidad de los metales pesados depende de su efecto oxidativo y de su forma iónica (Bolan *et al.*, 2014). Algunas características del suelo que mayor relación guardan con la movilidad y disponibilidad de metales pesados en el suelo, son el pH ácido, baja materia orgánica, presencia de óxidos de Fe y Mn y el contenido de arcillas (Alloway, 2013).

Los últimos estudios han indicado que los suelos y granos en áreas de cultivo de cacao podrían presentar altos niveles de metales pesados (Humani-Yupanqui *et al.*, 2012). Estos elementos una vez disponibles en el suelo pueden ser absorbidos por la planta de cacao, sin embargo, su distribución en la planta y su acumulación es variable. En el caso de Cd, no se conoce el papel fisiológico definido en la planta, pero puede concentrarse en las raíces, brotes, hojas o partes comestibles como granos y frutos (Augstburger *et al.*, 2000). Las hortalizas, incluyendo al cultivo de pimiento también son sensibles a la presencia de metales pesados en el suelo. Es importante conocer la procedencia de las hortalizas y el tipo de sustrato usado para su producción, de otro modo podríamos estar consumiendo grandes cantidades de metales pesados que podrían dañar nuestra salud.

Las concentraciones altas de metales pesados en las plantas sugieren riesgos para la salud humana y más aun considerando el cultivo de cacao, producto bandera del Perú y, el cultivo de pimiento que es muy cultivado y consumido en muchos países. Resulta interesante probar algunos métodos físico-químicos como Biochar y biológicos como hongos que causan micorrizas (HMA) y fitoextractores como la Commelina en sistemas agrícolas de cacao y pimiento a fin de disminuir la concentración de dichos metales en los frutos.

CAPITULO 1

Problema de contaminación de cultivos con metales pesados

Las características metálicas del Cadmio (Cd) y otros elementos pesados se deben a su peso específico alto y lo peligroso que puede resultar para la salud. Este elemento tiene efectos tóxicos en los seres humanos, se manifiestan principalmente en los huesos, riñones y sistema nervioso central. Cuando ingresa al organismo, puede producir enfermedades irreversibles en el ser humano, su efecto acumulativo, alta permanencia y alta movilidad a través del sistema líquido (los cuatro requisitos de los contaminantes más tóxicos) (Pérez-García y Azcona-Cruz, 2012).

El Perú es muy diverso en cultivos de cacao. El 60% de las variedades que existen en el mundo, están en el Perú, por lo cual nuestro país es uno de los mayores productores de cacao orgánico. La característica más importante del cacao peruano es su sabor y aroma especiales. The International Chocolate Awards en el año 2015 nominó al Perú como mejor productor orgánico de cacao y chocolate. Actualmente, esta potencialidad de nuestro país está siendo amenazada debido a la presencia de metales pesados como el Cd en los productos cosechados y en el suelo. Según Comex, la exportación de cacao en nuestro país disminuyó en 27,9% sólo entre enero y agosto del 2017, debido a la alta presencia de Cd en granos de cacao. Estas disminuciones en exportación del cacao podrían seguir empeorando, ya que ha entrado en vigencia la norma de la organización mundial del comercio (OMC).

En la cadena mundial de producción de cacao (consumidores, importadores, exportadores y productores) es preocupante la presencia de Cd en los granos de cacao y su efecto negativo sobre la salud de los consumidores. En enero del 2019 entró en vigencia en la unión europea, la norma que determina como contenido de Cd máximo en los productos derivados del cacao en un promedio de 0,5 mg kg⁻¹ (OMC). Estas exigencias son muy difíciles de complacer, debido a que nuestros productos de cacao todavía presentan altas concentraciones de Cd en los granos. En nuestro país, según las regiones, el grado de concentración de metales pesados en semillas de cacao es diferente (OJEU, 2014), muchas veces por encima de estos niveles límites permisibles (*i. e.* 0,5 ppm), ya que el cacao es un cultivo acumulador de Cd.

El destino final del Cd que absorbe la planta de cacao son los granos o semillas. Una vez disponible este elemento, las raíces lo toman y en 24 horas logra ingresar y moverse en el sistema vascular de la planta para ser distribuido a todas sus partes. Una vez presentes en el suelo, los metales pesados, es muy difícil eliminarlos ni por lavado, ni lixiviación. Aun no se conoce las fuentes de Cd en suelos cacaoteros de nuestra región Huánuco, sin embargo se sugiere que podrían ser el efecto de la aplicación de plaguicidas, fertilizantes, incendios forestales, minerías e industria. Vale aclarar que la planta de cacao no necesita Cd para sus procesos metabólicos. Los elementos que transportan Zn también transportan Cd y, si existe ausencia de Zn en el suelo, la planta tiende a absorber mayor cantidad de Cd. Se conoce que existe una mayor disponibilidad de Cd en suelos con pH ácidos. El pimiento es otro cultivo utilizado como indicador en diversos ensayos, para conocer la dinámica de los metales

pesados en el sistema planta-suelo contaminado con metales pesados. Es preciso mencionar también que existen genotipos de cacao (variedades de la especie) con mayor capacidad de absorción de Cd que otras. La distribución de Cd a los granos también es variable con el genotipo (Huamaní-Yupanqui *et al.*, 2012). Sin embargo, existen pocos trabajos que planteen alternativas de manejo de Cd en suelos contaminados.

El Perú, por sus condiciones políticas y económicas; su clima y biodiversidad para el cultivo de una amplia variedad de tipos de cacao; el reconocimiento por parte de la ICCO como país productor de cacao fino de aroma (CFdA), y una cultura cacaotera aún en crecimiento, es atractivo para empresas de la industria del cacao. Después de la República Dominicana y Ecuador, el Perú es uno de los mayores productores de cacao orgánico, la variedad más cultivada es el CCN-51. Sin embargo, el acceso a los mercados internacionales es especialmente difícil para los cacaoteros. La producción de cacao que cumpla con las exigencias de calidad de mercados internacionales se hace muy exigente. En cuanto al contenido de Cadmio en los granos implica que se debe emprender investigaciones que conduzcan a obtener herramientas que inmovilicen y/o secuestren cadmio, reduciendo la traslocación a granos de cacao para incrementar la posibilidad de obtener granos de cacao con contenidos tolerables y admitidos de cadmio en los mercados. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) indicó que el Cd es un cancerígeno humano. El consumo de este elemento, considerado como uno de los más tóxicos, puede provocar problemas de salud, como debilitamiento óseo, diarrea y vómitos, daños al sistema nervioso central y en el sistema inmunológico.

La región de Huánuco está compuesta del 61% de selva y 39% sierra, en la zona selva se realiza una intensa producción del cultivo de cacao con un promedio de rendimiento de 750 kg ha⁻¹, cerca del 90% de esta producción es exportada a países de la Unión Europea. El cultivo de cacao en la región está ligado directamente a más de 30 000 familias, e indirectamente a 150 000 personas que forman parte de la cadena productiva. En los últimos años se ha reportado un progresivo aumento en los niveles de Cadmio en algunos suelos agrícolas como consecuencia de una prolongada fertilización fosfatada con roca fosfórica, y ha llamado la atención sobre la posibilidad de mayores incrementos en otros suelos debido al uso agrícola de materiales contaminados con cadmio. Además del cacao, el pimiento es muy sensible a la presencia de metales pesados en el suelo, su uso en medios experimentales ha resultado en conocer la dinámica del Cd en el suelo-planta.

En nuestro país se han llevado adelante varios esfuerzos para analizar suelos, frutos y el grano en zonas productoras de cacao. Estos estudios sugieren que ciertos factores en el suelo, como los orígenes del material parental, pudieran estar relacionados con contaminaciones que se presentan ocasionalmente, no se conoce con certeza las fuentes de Cd en el suelo.

En la región Huánuco se han establecido zonas con concentraciones no permisibles de cadmio por la norma del ICO según su la regulación UU. EE. 488/2014 publicada en mayo de 2014; donde se establecen los valores permisibles de cadmio, en las diferentes presentaciones del cacao y que entraron en vigencia a partir del 2019. Con esta norma, más del 50% de productores de la región se ven afectados, lo que podría acarrear conflictos sociales y refugio de los productores en actividades ilícitas. Se ha investigado sobre la concentración de Cadmio en los suelos agrícolas y en almendras de cacao, sin embargo, existen escasos trabajos de investigación que propongan alternativas de manejo de Cd en suelos contaminados usando métodos físicoquímicos y biológicos.

Ante este escenario es que se plantea desarrollar el presenta trabajo que tiene por propósito principal evaluar alternativas de manejo de Cd y Pb en suelos contaminados para disminuir su

concentración en frutos del pimiento y granos de cacao por debajo de los límites establecidos por la International Cacao Organization. Nuestra hipótesis es que los métodos físico-químicos y biológicos reducen la concentración de Cd y Pb en órganos cosechables del pimiento y cacao, en condiciones de suelos contaminados con metales pesados.

Definición de términos operacionales

Métodos físicos: Métodos que consisten en incorporar enmiendas al suelo, su objetivo es secuestrar o inmovilizar metales pesados en el suelo, es decir hacerlos no disponibles para las plantas.

Métodos biológicos: Es el uso de plantas o microorganismos vivos para extraer metales pesados del estado disponible del suelo.

Cadmio y Plomo disponible en el suelo: Concentración de Cadmio y Plomo en la fracción disponible del suelo, de donde las plantas tienden a absorberlo en forma inmediata.

Cadmio y Plomo total en el suelo: Concentración de Cadmio y Plomo en la fracción mineral, más en la materia orgánica, más en el agua del suelo, más en la fracción intercambiable.

Concentración de Cd y Pb en agua capilar. Cadmio y Plomo en el agua que las plantas absorben.

Cadmio y Plomo en planta: Concentración de Cadmio y Plomo en la biomasa vegetal (hojas, tallo, raíces y frutos).

Inmovilización de metales pesados en el suelo: Acomplejamiento del Cd y Pb intercambiable ó Cd y Pb disponible a otros elementos que se encuentran en la fracción no disponible del suelo.

Límites máximos permisibles de Cd en granos de cacao: Es la concentración máxima permitida de Cd en granos de cacao regulada por la Unión Europea, como condición para que el producto sea de buena calidad y exportable.

CAPITULO 2

Antecedentes y bases teóricas

2.1. Antecedentes

El cultivo de cacao es uno de los principales cultivos de la región Huánuco. Las exportaciones de cacao se realizan al mercado europeo (Francia, Inglaterra, Bélgica) y, los Estados Unidos. Nuestro país es el primer productor mundial de este cultivo fino y de un aroma incomparable. Sin embargo, el contenido de cadmio en los granos o semillas de este cultivo sobrepasan a los límites máximos permisibles establecidos por la International Cacao Organization (i. e. 0.5 ppm), esto implica que se debe disminuir la presencia del Cd en el suelo para evitar sus altas concentraciones en las semillas. La contaminación de suelos con cultivo de cacao es un problema en nuestra región. No se conoce con precisión las fuentes de este elemento pesado. Los pocos estudios que existen en la región muestran relaciones entre la concentración de metales pesados en el suelo y planta, las implicancias de este problema son claras, se debe trabajar en disminuir este elemento en el suelo. Otros cultivos afectados por la contaminación de suelos con metales pesados, son el pimiento, papa y entre otros. Se dice que las fuentes de contaminación de suelos ocurren de forma natural mediante las erupciones volcánicas, la mineralización del material parental o inducidas por el hombre, donde sobresalen los residuos mineros, quemados de basuras urbanas, uso de lodos urbanos en la agricultura, agroquímicos, gases provenientes de las industrias, quema de combustibles fósiles, etc.

Los metales pesados como Cd y Pb se encuentran en condiciones naturales en la corteza terrestre, de donde las plantas los toman y mediante la cadena trófica pueden terminar en el organismo humano pudiendo causar daños (Prieto *et al.*, 2009). Existen estudios que indican que las plantas de cacao absorben metales pesados del suelo y los incorporan en los granos (Augstburger *et al.*, 2000). La presencia de estos metales en los granos perjudica la calidad de los productos. El cultivo de pimiento tiene una parte cosechable muy sensible a la presencia de elementos pesados en el suelo, producto de altas concentraciones en las fracciones disponibles, éstos pueden elevar sus contenidos en el órgano comestible y causar daños fisiológicos en las personas que consumen estos productos.

Algunos antecedentes en el tema han llegado a ciertas controversias debido a la variabilidad de los resultados obtenidos. Por un lado, Arevalo *et al.* (2016) en un estudio realizado con el objetivo de determinar los contenidos totales de metales pesados (Cd, Ni, Pb, Fe, Cu, Zn, Mn) en los suelos de plantaciones de cacao en las principales áreas de producción del Perú, realizado en la zona norte (Tumbes, Piura, Cajamarca y Amazonas), centro (San Martín y Huánuco) y sur del Perú (Cusco), vieron que los metales pesados estuvieron por debajo de lo considerado como fitotóxico. Los mayores valores promedios de Fe, Zn, Mn, Ni y Cd en la zona sur, mientras que en la zona norte los valores de Cu y Cd fueron mayores. El pH, % de arcilla y Mg fueron las variables que tuvieron mayor correlación con la concentración de metales pesados en los suelos. Por otro lado, Huamaní-Yupanqui *et al.* (2012) informaron que en la

zona de Tingo María no se han logrado determinar el origen de los metales pesados presentes en el suelo. Los estudios realizados en esa región mostraron valores promedios de 0,21 ppm de cadmio y 0,58 ppm de plomo en tejidos foliares del cultivo de cacao. Las concentraciones de ambos elementos en suelo y planta correlacionaron bien. Según Kabata-Pendais (2000) las hojas maduras pueden tolerar concentraciones de metales pesados como máximo 0,5 ppm en el caso del cadmio y 10 ppm en el caso del plomo. Cárdenas (2012) informó que las concentraciones de Cd en semilla de cacao en parcelas de Huánuco se encontraban por encima de los niveles permisibles (0,5 ppm) en las riberas de los ríos Huallaga y Tulumayo. En otro estudio realizado por Washl citado por Cárdenas (2012) informaron que el Cd estaba presente en los sedimentos del río Huallaga, las mayores concentraciones se veían en épocas secas, entre mayo y agosto con valores entre 1,28 y 2,57 ppm. En suelos residuales y aluviales de San Martín y Huánuco, Tantalean y Huauya (2017) reportaron valores de Cd disponible en el suelo residual de 1,71; 2,55; 3,68 y 1,80 ppm en el horizonte A y capas AC, C1 y C2 respectivamente. Ellos también vieron Cd total en tejidos de 1,14; 2,97; 2,84; 1,08 y 0,75 ppm correspondientes a raíces, ramas, hojas, almendras y cáscaras de cacao. Sus conclusiones indicaron que el suelo aluvial contiene mayor contenido de Cd disponible y, en cuanto a los tejidos, el mayor contenido de Cd se presentó en las ramas tanto en suelo residual como en el suelo aluvial. Los efectos tóxicos del Cd sobre las plantas se han estudiado bastante, sin embargo aún se desconocen los mecanismos de su toxicidad. El Cadmio interfiere en la entrada, transporte y utilización de elementos esenciales (i. e. Ca, Mg, P y K) y del agua, lo cual provoca desequilibrios nutricionales e hídricos en la planta (Miranda *et al.*, 2008). El Cd puede modificar la apertura de estomas y transpiración (Rodríguez *et al.*, 2008) y puede sustituir al ion Mg en la molécula de clorofila, disminuyendo la captación de fotones, esto disminuye la actividad fotosintética (Pernía *et al.*, 2008). Este elemento también reduce la absorción de nitratos y el transporte de los mismos de la raíz al tallo. Por lo cual, un síntoma muy común de la toxicidad por Cd es la clorosis debido a la deficiencia de Fe, fosfatos o por la reducción del transporte de Mn. Los cultivos agrícolas absorben los metales pesados en la fracción disponible en el suelo y los concentra en las semillas (Barrueta, 2015). En otro trabajo realizado en suelos contaminados de Tingo María, mostraron que el pH de los suelos no guardó relación con la concentración de Cd en granos de cacao, lo cual sugiere que el cultivo de cacao es acumulador de Cd en sus órganos, principalmente en los granos.

Por otro lado, Pérez-Moncada *et al.* (2019) realizaron un trabajo con el objetivo de evaluar la absorción de Cd en un patrón de cacao (IMC 67) en asociación con hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) para determinar su uso potencial como inmovilizadores de Cd a mediano y largo plazo. Sus resultados mostraron que las plantas de cacao traslocan el Cd fácilmente a todos los órganos (tallos, hojas y raíces), es decir pueden vivir en estas condiciones, sin embargo, las plantas inoculadas con HFMA-nativos disminuyeron significativamente la acumulación de Cd en todos los órganos evaluados, confirmando los efectos benéficos que tienen los HFMA para aliviar el estrés que presentan las plantas frente a la traslocación de metales pesados como es el Cd. En otra experiencia realizada por Condezo y Huaraca (2018) se propuso como objetivo evaluar la eficiencia de la aplicación de Biochar de rastrojos vegetales en la inhibición de la biodisponibilidad de Cd en suelos contaminados. El proceso de experimentación duró 26 días. Los resultados indicaron que al aumentar la cantidad de biochar en un 20% la retención de Cd en el agua es de 92,3% y, con una aplicación de biochar al 10% la retención de Cd fue de 84,6%. Ellos concluyeron que el biochar tiene propiedades buenas para inhibir Cd en suelos. Por otro lado, Wang *et al.* (2018) en su trabajo "Review on utilization of biochar for metalcontaminated soil and sediment remediation" con el objetivo de reducir la concentración de contaminantes y disminuir sus propiedades de movilidad

y biodisponibilidad; la interacción entre las características del metal y su biodisponibilidad. Ellos discuten el uso del biochar como una estrategia potencial para el manejo de sedimentos contaminados especialmente en lo que respecta a la planificación in situ. Finalmente, destacan la posibilidad de la aplicación de biochar como una enmienda efectiva y proponen más direcciones de investigación para garantizar el uso seguro y sostenible del biochar como una enmienda para la remediación de suelos y sedimentos contaminados. Frente a los problemas de contaminación de suelos con metales pesados, algunos autores han propuesto algunas alternativas para reducir su movilidad y acumulación de Cd, en algunos casos el uso de enmiendas alcalinas en especial en suelos ácidos, otros han propuesto materiales orgánicos recalcitrantes que reducen la movilidad de metales pesados en el suelo (Cui *et al.*, 2011).

Los antecedentes de contaminación de suelos con Cd y su efecto sobre los órganos cosechables de las plantas son claros, nuestros suelos cacaoteros tienen altos contenidos de Cd que están perjudicando a la calidad de los productos. Existe la necesidad de generar alternativas para el manejo de Cd en suelos, que sean prácticas, eficientes y fáciles de aplicar. El uso de métodos físicoquímicos y biológicos podrían ser buenas alternativas para disminuir el efecto de los metales pesados en la calidad de las cosechas.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Contaminación del suelo y plantas con metales pesados

Los metales pesados son elementos con propiedades metálicas como ductibilidad, conductibilidad, densidad, estabilidad como catión y especificidad a ligando (Garbisu y Alkorta, 2003). Estos elementos son compuestos recalcitrantes, persistentes y biomagnificables (Cañizares, 2000). Una vez presentes en el suelo, los metales pesados forman complejos como iones y por otro lado, también pueden participar en reacciones redox que resultan potencialmente tóxicos para los organismos (Marrero, Díaz y Coto, 2010). Si bien, algunos metales no tienen influencia biológica, otros como el cadmio y mercurio son tóxicos incluso para los microorganismos del suelo (Nessner y Esposito, 2010). La presencia de los metales pesados en el suelo y su consecuente absorción por los cultivos, se constituye como contaminación del agrosistema. Las respuestas de las plantas pueden ser distintas según las características genéticas y fenotípicas de la especie y variedad.

Las acciones biológicas de los metales pesados son muy diferentes debido a la heterogeneidad química de los mismos y, a los distintos grados de afinidad con el oxígeno, nitrógeno y azufre (Nieboer y Richardson, 1980). Esta complejidad afecta a las concentraciones de los metales en el suelo, las características de las sustancias orgánicas e inorgánicas, pH, estado redox y especiación química. Las interacciones suelo-planta de la rizósfera también están directamente relacionados con la disponibilidad, toxicidad y respuesta de las plantas al estrés por metales pesados (Marschner, 1990). Por lo cual, los efectos de estos elementos en el suelo son muy distintos. Las acciones fisiológicas que pueden ser producidos por los metales pesados son, la absorción, transporte y acumulación de los metales por la planta; toxicidad a nivel molecular, celular y subcelular; interferencia con los procesos funcionales de las plantas; respuesta homeostática que pueden conducir a mecanismos de resistencia frente al metal pesado (Barceló y Poschenrieder, 1992).

Los metales pesados presentes en el suelo y, en consecuencia al ser absorbidas por las plantas se constituyen un agrosistema contaminado. Basta y McGowen (2004) y Cao *et al.* (2002) indicaron que la absorción del metal por las plantas dependen del pH, a pH bajos se

solubiliza y hacen disponibles con mayor facilidad. Los metales pesados acumulados en el suelo superficial pueden alcanzar altos niveles de contaminación afectando a sus propiedades biológicas y estructura física del suelo. Estos efectos se pueden ver en las plantas, muchas veces terminan concentrándose en los frutos y, terminar por contaminar a las personas que consumen estos frutos.

Las raíces son los principales órganos de las plantas para absorción de metales pesados. No se conoce con seguridad sobre los mecanismos de absorción de los elementos no esenciales (i. e. metales pesados). Sin embargo, se sabe que afectan a las interacciones con las ATPasas y a las modificaciones de las propiedades de semipermeabilidad de las membranas y del balance iónico. Las acumulaciones de metales pesados por los órganos de las plantas son muy diferentes. Si bien, el órgano de absorción y acumulación es la raíz, las partes aéreas (hojas y tallos) acumulan más metales pesados (Beltrán-Pineda y Gómez-Rodríguez, 2016). Vazquez *et al.* (1992) informaron que en muchas especies y variedades, los metales pesados se han concentrado en la vacuola y pared celular. Estos elementos siguen la vía apoplástica desde la raíz. Luego, siguen la vía del xilema, llegando a afectar a las células vecinas e induciéndolos a cambios en la pauta de diferenciación del propio sistema vascular. En concentraciones menores, incluso pueden alcanzar a las hojas y alterar la estructura y funcionalidad de las células fotosintéticas (Van Assche y Clijsters, 1990).

Los síntomas más notorios a simple vista en las plantas cuando existe fitotoxicidad por metales pesados, son la reducción del crecimiento, principalmente de raíces, clorosis y necrosis en hojas, luego senescencia y abscisión (Vazquez *et al.*, 1989). El síntoma más común es el bajo desarrollo de las raíces, debido a que las membranas y la pared celular son donde empiezan a producirse los cambios de transporte de fotosintatos. A nivel celular, la disminución de la integridad de las membranas pueden causar eflujo de iones (Foy, Chaney y White, 1978), sobre todo de K, la disminución de la síntesis del material de la pared celular y la reducción de su extensibilidad y los efectos sobre el citosol y los orgánulos (cloroplastos, mitocondrias y aparato de Golgi). Los metales pesados inhiben también sobre la síntesis de enzimas, síntesis de clorofila, cadena de transporte fotosintético de electrones y de la fotofosforilación (Becerril *et al.*, 1988; Stiborova *et al.*, 1986). Consecuencia de estos efectos son las variaciones en la regulación del balance de distribución de los asimilados en los distintos órganos de la planta y el desequilibrio que se produce en el balance de los nutrientes.

Los metales pesados en el sistema suelo-planta

Los metales pesados en el suelo pueden provenir del material parental meteorizado y de las actividades humanas, como la minería, la agricultura, la industria, entre otras fuentes. La aplicación de fertilizantes, fungicidas y herbicidas con alto contenido de elementos pesados pueden ser algunas de las causas de la contaminación de suelos (Alloway, 2013). La alta concentración de metales pesados en el suelo no siempre significa toxicidad para los seres vivos. Las formas químicas de los metales pesados que se encuentran disponibles resultan ser tóxicos para los seres vivos, incluyendo a las plantas. La disponibilidad de estos elementos depende de las características físicas y químicas de cada suelo (Lu, Zhang y Shan, 2005), de su afinidad con las superficies de adsorción del suelo (Alloway, 2013). Los suelos con pH bajos permiten mayor movilidad y disponibilidad de estos elementos, a pH alcalinos forman carbonatos o fosfatos minerales insolubles no disponibles (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005). Los metales pesados en condiciones oxidantes (mayor aireación) también se hacen más solubles (Alloway, 2013). Por el contrario, enmiendas con alto contenido de materia orgánica disminuyen la disponibilidad de metales pesados, debido a que forman complejos con las

fracciones húmicas. Los metales pesados en forma insoluble asociada a la materia orgánica, arcillas o a los carbonatos no son problema para los seres vivos (Clemente, Escobar y Pilar, 2006). El problema surge cuando estos metales pesados aumentan su disponibilidad y al ser absorbidos se acumulan en los órganos vegetativos de las plantas. Mediante la cadena trófica pueden terminar perjudicando a los seres vivos y al hombre.

En el suelo existen varias fracciones las cuales intervienen en la toma de nutrientes y otros elementos por las plantas. La fracción total del suelo incluye a los elementos estructurales (elementos que se encuentran en los minerales), fracción orgánica (elementos presentes en la materia orgánica del suelo) de donde mediante la mineralización pueden liberar a los elementos a la forma disponible, fracción intercambiable (elementos que se encuentran en forma iónica y en constante intercambio entre la solución suelo y la fase sólida del suelo), fracción disponible (elementos que están disponibles y disueltos en el agua del suelo). Las plantas suelen tomar a los elementos desde la fracción disponible y en algunos casos desde la fracción intercambiable. La rizósfera de las plantas, en general, está cargada con aniones y se pueden producir intercambios catiónicos. El Cd y Pb en forma iónica en el suelo pueden ser tomadas por las raíces de las plantas, así como de la fracción disponible.

2.2.2. Recuperación de suelos contaminados con metales pesados

Los metales pesados pueden descomponerse por la vía biológica, física o química. La recuperación de suelos con metales pesados depende de su afinidad con las superficies de intercambio, de su grado de solubilidad, movilidad y/o toxicidad. El cambio de su estado de valencia favorece a su inmovilización mediante la quelación y/o movilización mediante la disolución (Bosecker, 2001).

Los métodos de recuperación de suelos contaminados con metales pesados pueden ser físicoquímicos y biológicos. Los primeros, utilizan propiedades físicas y químicas de los contaminantes o del suelo para transformar, separar o inmovilizar el contaminante (Dermont *et al.*, 2008). Los métodos biológicos también toman el nombre de biorremediación, se realizan aprovechando el potencial metabólico de organismos vivos como plantas, bacterias y hongos para eliminar a los metales pesados del suelo (Gadd, 2010).

Los métodos de recuperación físicoquímicos consisten en procesos como la oxidación/reducción (transformación) de los metales pesados y la solidificación/extracción (inmovilización) de los mismos. La desventaja de estos métodos es, que requieren excavaciones en el suelo lo que puede significar un costo ambiental y económico. Un trabajo realizado por Obaji *et al.* (2017) vieron que los metales pesados eran más retenidos utilizando enmiendas orgánicas. Ellos vieron que los lombriabonos, árbol descompuesto y biochar tuvieron los mejores resultados en la retención de Cd y Pb en el suelo. El biochar por su gran superficie específica y contenido de carbono aromático de alta estabilidad (celulosa cristalizada) tienen mayor capacidad de absorción de metales pesados (Jindo *et al.*, 2014). Por otro lado, en el mismo ensayo de Obaji *et al.* (2017) vieron también que la piedra pómez tiene buena capacidad de retener a los metales pesados, también se atribuye a su elevada superficie específica que posibilita más sitios activos para la adsorción de metales pesados (SiO_2 , Al_2O_3 y Fe_2O_3). La cascarilla de arroz y fibra de coco fueron los tratamientos que menos retuvieron a los metales pesados debido a sus bajos valores de pH. Los métodos físicoquímicos han mostrado ser buenas alternativas de manejo de metales pesados en suelos contaminados.

Los métodos biológicos o biorremediación implica la descontaminación del suelo por vía biológica. Algunos microorganismos tienen la capacidad de movilizar o inmovilizar estos

metales pesados (Lovley y Coates, 1997). Las bacterias y hongos que resultan en procesos microbianos pueden actuar en el tratamiento de suelos contaminados con metales pesados. Una vez en la superficie celular, los metales pesados se internalizan en la célula, para ser precipitados dentro de vacuolas, minimizando su toxicidad. Las plantas fitoextractoras también están dentro de los métodos biológicos, son especies que tienen gran capacidad de acumular (hiperacumuladoras) metales pesados en sus partes vegetativas. Una vez realizado el proceso de acumulación de los metales pesados en las plantas, se procede a eliminarlos desde la raíz, esa es la forma cómo actúan las fitoextractoras.

a. El biochar en la recuperación de suelos contaminados con metales pesados

Biochar (palabra inglesa de reciente aparición) en español es biocarbón. Este material es una enmienda de granos finos y porosos de similar apariencia al carbón vegetal. Su producción es a partir de los distintos tipos de biomasa, mediante la técnica de pirolisis (a 500°C), el cual consiste en la descomposición térmica de la materia orgánica bajo condiciones limitadas de oxígeno, lo que lo hace distinto al carbón vegetal usado como combustible. The International Biochar Initiative (IBI) trabaja en la promoción de este material. Algunos científicos como Lehmann *et al.* (2002) informaron que el uso del biochar en Japón es muy común desde la década de los ochenta, cuando se intensificó su investigación. En Inglaterra también, el biochar fue un tema de investigación en la agricultura desde fines del siglo XIX y a lo largo del siglo XX (Paco, 2012). Sin embargo, en nuestro país es de aplicación reciente y no se conocen con precisión sobre sus efectos.

La producción y uso del biochar incide en el ciclo del carbono. Se convierte en un almacén de C en el suelo, atendiendo a la supuesta estabilidad del carbono en forma de biochar y a la recalcitrancia de este material (Paco, 2012). El secuestro del C atmosférico es el principal factor que considera la aplicación del biochar en el suelo. Se destaca también, que la producción de biochar con tecnología adecuada y moderna no libera gases de efecto invernadero u otras sustancias como hollín.

Los conocimientos sobre el biochar son recientes y resultan muy variables dependiendo del tipo de estudio que se realiza (Sohi *et al.*, 2009). Sin embargo, se ha comprobado su estabilidad, el cual mejora el crecimiento de las plantas y secuestro de carbono en el suelo (Lehmann *et al.*, 2002). Algunos estudios han mostrado aumentos en la disponibilidad de nutrientes para las plantas, en parte por mejorar la capacidad de intercambio catiónico en el suelo, así como la estimulación de los procesos biológicos que permiten mejorar la estructura del suelo y la capacidad de almacenamiento de agua. Estos estudios también indicaron que este material tiene la capacidad para reducir la lixiviación y escorrentía superficial, aumentar el pH del suelo, así como la absorción de pesticidas y metales pesados.

El efecto principal del biochar es en el aumento de la productividad y calidad del suelo, principalmente en los suelos ácidos y pobres en nutrientes (e. g. oxisoles). Sohi *et al.* (2009) en un estudio de 13 autores distintos informaron incrementos en productividad de los distintos cultivos por efectos del carbono. Los mecanismos de acción del biochar para el aumento de las cosechas son tres, el primero es la modificación directa de la química del suelo, el segundo es debido a la alta superficie químicamente activa que permiten mejorar la dinámica de los nutrientes en el suelo aumentando su fertilidad y, el tercero es la modificación física del suelo, que beneficia al crecimiento de las raíces y aumenta la retención de agua y nutrientes. En general, los beneficios del uso de biochar son muchos. Una de las razones más comunes por

las que se usa al biochar en suelos contaminados, es producir una inmovilización de los metales pesados de la fracción disponible y mediante reacciones de quelación, atraparlos en la superficie del biochar, esto debido a que el biochar tiene una alta superficie específica.

b. Recuperación de suelos contaminados mediante métodos biológicos

Los métodos biológicos usados para recuperación de suelos contaminados también toman la denominación de biorrecuperación. La biorrecuperación usa organismos vivos o sus metabolismos para acumular, transformar o degradar contaminantes (Bandyopadhyay *et al.*, 1994).

Los métodos tradicionales de recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizan métodos de ingeniería y tratamientos químicos. Estas tecnologías consideran la excavación y los rellenos sanitarios, lavado del suelo, tratamientos térmicos y eléctricos. Los tratamientos químicos hacen uso de enclados y aplicación de agentes quelatantes, agregado de fosfatos. Vale señalar que estos elementos son altamente adsorbentes, algunos fosfatados son zeolitas, aminosilicatos, etc. (Vangronsveld y Cunningham, 1998).

Las tecnologías biológicas hacen uso de microorganismos y plantas para remover, contener o retener contaminantes ambientales sin causar daños al suelo (Cunningham y Lee, 1995). Estas tecnologías se han utilizado en el tratamiento de varios tipos de contaminantes del suelo y agua, como: hidrocarburos, plaguicidas, sustancias radioactivas y contaminantes orgánicas. La aplicación de tecnologías biológicas en la remediación de suelos contaminados es reciente y todavía hay mucho que explorar. Las tecnologías biológicas son más económicas que las de ingeniería o procesos químicos, así también no existe riesgos de exposición para el personal que manipula el material contaminado. Al ser tecnologías naturales, el impacto ambiental de dichas tecnologías biológicas es mínima, además no causa perturbaciones en el suelo (Skladany y Metting, 1993). Los métodos biológicos se aplican cuando los contaminantes están en la superficie y no son lixiviados, además de que requieren tiempo para disminuir el riesgo, ya que pueden cubrir extensas áreas (Stomp *et al.*, 1994). Para obtener resultados exitosos se debe realizar la selección de especies adaptadas a condiciones de contaminación.

Las metófitas son especies vegetales que tienen bien desarrollados los mecanismos fisiológicos para resistir, tolerar y sobrevivir en suelos con altos niveles de metales pesados. Los estudios genéticos de especies vegetales con estas características mostraron que han tomado cientos, miles o millones de años en desarrollar mecanismos de supervivencia a condiciones tóxicas (Shaw, 1990). Las estrategias de sobrevivir a estas condiciones pueden ser la de tolerancia o resistencia. La mayor parte de las especies tolerantes a metales pesados son especies que impiden su entrada en la raíz. Sin embargo, las especies más raras y escasas son las tolerantes, especies que acumulan metales en sus tejidos aéreos, incluso cuando la concentración de metales en el suelo es muy baja, estas especies son hiperacumuladoras (Becerril *et al.*, 1988). La reacción de estas especies frente al estrés biótico se debe a su función defensiva (Poschenrieder *et al.*, 1989), forman complejos metálicos en el citosol mediante compuestos orgánicos producidos por las plantas y compartimentan el almacenamiento de metales en las vacuolas. La especie *Thlaspica erulescens* (nombre común: Viola baoshanensis) es una especie hiperacumuladora de Zn. Esta especie se considera como modelo en los estudios de tolerancia a metales de fitoextracción. (Becerril *et al.*, 1988). Existen 50 especies identificadas dentro del grupo de las tolerantes. Algunas de las especies hipertolerantes en lugares con alta concentración de metales son: *Thlaspicaerulescens*, *Jasione montana* L., *Rumex acetosa* L. y *Festuca rubra* L. (Becerril *et al.*, 1988). Algunas especies usadas como hiperacumuladoras son el Kudzú, maní forrajero, girasol, comelina; sin

embargo no existen estudios en detalle que demuestren que son eficientes para remediar suelos contaminados.

b.1. Mecanismos de resistencia de las plantas a los metales pesados

Las metalófitas son plantas adaptadas a suelos con altas concentraciones de metales pesados. Estas plantas pueden tener mecanismos naturales de adaptación al estrés químico por metales pesados. El grado de capacidad de resistencia o tolerancia a la toxicidad de metales pesados difiere con las especies, tanto desde el punto de vista de los mecanismos como de amplitud y distribución en las distintas especies, o incluso en variedades o ecotipos de una misma especie.

Las metalófitas han evolucionado bastante durante miles de años de su existencia. Los mecanismos de acción de estas plantas son dos: (a) la exclusión del metal (las evitan) y (b) la tolerancia al metal. La tolerancia parece depender de varios genes con carácter aditivo y dominante, aunque se han visto casos de tolerancia ligada a un único gen (Blum, 1988; Clark, 1982). En suelos contaminados con diferentes metales se han comprobado que las plantas pueden presentar tolerancia múltiple, en algunos pocos casos han observado cotolerancia (tolerancia a un metal presente inducido por otro presente). El mecanismo de la tolerancia es lo que presentan las fitoextractoras hiperacumuladoras, que acumulan grandes cantidades de metales pesados en su organismo.

b.2. Microorganismos usados para aumentar la tolerancia a metales pesados en suelos contaminados

Los suelos con presencia de metales pesados, en general contienen bajas proporciones de poblaciones microbianas. Las especies de microorganismos que pueden crecer en esas condiciones tóxicas son tolerantes o resistentes a los metales. La resistencia es la capacidad de supervivencia de los microorganismos a los efectos tóxicos del metal por medio de mecanismos de detoxificación, mientras que la tolerancia es la capacidad del microorganismo de sobrevivir frente al efecto nocivo gracias a la modificación ambiental de la toxicidad del elemento (Dhal *et al.*, 2013).

La limitación de nutrientes disponibles en ambientes contaminados permite la metabolización de contaminantes orgánicos y oxidación de metales pesados por las comunidades bacterianas. La existencia de estos microorganismos pueden tener efectos de factores como el pH, presencia de nutrientes y especialmente humedad y temperatura. Las tasas de aireación en el suelo, presencia de cultivos, estaciones y profundidad de la capa arable pueden afectar a estos microorganismos (Kavaruma y Esposito, 2010).

La capacidad de las bacterias y hongos por transformar metales pesados como Cr, Cd y Hg se pueden desarrollar. Los hongos micorriza arbuscular (HMA) pueden ser usados en procesos de fitorremediación (Khan, 2006). Existen estudios de varias especies de HMA con estas cualidades, dentro de una misma especie también pueden haber diferencias en su sensibilidad a los metales pesados (Khade y Adholeya, 2007). Los hongos micorrícicos pueden disminuir la toxicidad del metal para su planta hospedera uniendo iones a su pared celular o rodeándolos con polisacáridos (Rajendran *et al.*, 2003). Zimmer *et al.* (2009) evaluaron el efecto de la inoculación dual de hongos ectomicorrícicos y las bacterias *Micrococcus luteus* y *Sphingomonas* ssp. sobre el crecimiento de plantas de sauce (*Salix* sp) en suelos contaminados con metales. Estas asociaciones tienen gran potencial biorremediador. Algunos géneros microbianos utilizados para remover Cd, Pb y Cu son *Rhizopus*, *Penicillium* y *Phanerochaete* (Say *et al.*, 2001).

2.3. Bases conceptuales

Remediación de suelos: Generalmente, remediación significa dar remedio. Es la remoción de contaminantes del suelo y aguas del mismo para la protección general de la salud humana y del ambiente, o de tierras provistas para el desarrollo. Generalmente, es regulatorio y, además puede estar basado en gravámenes de salud humana y riesgos ecológicos donde no existen estándares legislados o donde los estándares son consultivos.

Métodos físico-químicos de remediación de suelos: Consiste en modificar materiales peligrosos de forma que lleguen a ser no tóxicos y si es posible, recuperar alguno con cierto valor económico. Son técnicas mediante las cuales se consigue acondicionar el residuo para su utilización o como fase previa antes del tratamiento final. La ventaja de este tratamiento es que además de eliminar sustancias tóxicas permite conservar y reciclar recursos.

Métodos biológicos para remediación de suelos: Llamado también biorremediación como solución a problemas de contaminación. Se presenta como una alternativa altamente recomendable debido a su bajo impacto al medio ambiente, producción mínima de residuos y por lo general son residuos problemáticos que los tratados, por utilizar a la célula como máquina de transformación y operación.

Calidad de granos de cacao: La calidad del cacao para chocolate depende de qué tan fino es el cacao. Eso depende del aroma y el sabor de sus granos. Esta calidad está relacionada con el origen de las almendras, el proceso de fermentación, los cuidados a la hora del secado y almacenamiento.

2.4. Bases epistemológicas o bases filosóficas o bases antropológicas

2.4.1. Teorías de remediación de suelos.

Arevalo *et al.* (2016) indicaron que la remediación de suelos contaminados está relacionada al uso de métodos para eliminar, inmovilizar o extraer contaminantes. Rehabilitar el sistema suelo es depurar los contaminantes. La degradación de compuestos dañinos se acelera mediante la actividad de algunos microorganismos.

Para Clemente *et al.* (2006) la remediación se basa principalmente en las interacciones entre las plantas, el suelo y los microorganismos por acción de distintos métodos que existen. El suelo es una compleja estructura que sirve de soporte para el desarrollo de las plantas y los microorganismos que se alimentan de los compuestos orgánicos o inorgánicos que lo componen. Cuando alguno de estos compuestos se encuentra en exceso con respecto al estado inicial del suelo, éste se describe como suelo contaminado (esto también se aplica al agua y al aire). Los compuestos en exceso pueden ser utilizados como fuente de energía por las plantas y los microorganismos han co-evolucionado para adoptar una estrategia de aprovechamiento recíproca, para soportar la fitotoxicidad, de la que los microorganismos los exudados de la raíz también la planta se beneficia de la capacidad de degradación de los microorganismos rizosféricos para reducir el estrés debido a la fitotoxicidad. En última instancia, la planta es el agente esencial de la exportación de un contaminante fuera de su entorno.

2.4.2. Teoría de degradación de suelos.

Para Obaji (2017) degradación del recurso suelo es la desnaturalización del sistema natural del suelo por intervenciones naturales o antrópicas. La erosión natural, de causas geológicas y climáticas es un proceso lento, sin embargo la erosión antrópica es acelerada. Desde el punto de vista social, tanto la sequía como la degradación del suelo favorecen la pobreza al romper estructuras sociales y familiares, y provocar inestabilidad económica.

2.4.3. Bases o Fundamentos filosóficos del tema de investigación

La filosofía del medio ambiente estudia el entorno natural y la posición de los seres humanos dentro de ella. La concepción sobre el ambiente y la aplicación de las teorías, leyes, principios, postulados, categorías, conceptos, definiciones y la normatividad ambiental servirán como reflexión filosófica al tema de estudio. La filosofía del uso métodos de extracción e inmovilización de metales pesados en suelos contaminados con Cd señala como ventaja mejorar la calidad de los productos de cacao, acordes con las exigencias de la ICCO. El concepto de remediación hace referencia a la aplicación de estrategias para evitar o disminuir la contaminación del suelo. Con base en una revisión bibliográfica se explican los mecanismos biológicos, ecológicos, económicos y sociales que sustentan la capacidad remediadora de diversas técnicas, lo que permite seleccionar los métodos adecuados de acuerdo con el nivel de afectación.

a) Epistemología Ambiental. Nuestra naturaleza está cada vez más deteriorada y agredida. Crecen los desiertos, se degradan los suelos y se destruyen las selvas por efectos antrópicos. A diferencia de otras disciplinas, se conoce parcialmente las teorías científicas sobre el medio ambiente y desarrollo sostenible. La epistemología ambiental va desde el positivismo a la fenomenología, de lo cuantitativo a lo cualitativo pasando por todas las variantes de ambas teorías.

Conocimientos sobre el medio ambiente y desarrollo sostenible

1) Conocimiento teórico científico del ambiente:

El medio ambiente es el conjunto de componentes físicos, químicos y biológicos externos con los que interactúan los seres vivos. No solo incluye el espacio en el que se desarrolla la vida, sino también seres vivos, agua, suelo y aire y, las interacciones entre ellos. Se trata del entorno que condiciona la forma de vida de la sociedad, lo que a su vez incluye valores naturales, sociales y culturales en un lugar y tiempo determinado. Por lo tanto, si se quiere referir a calidad ambiental involucra la calidad de todos sus componentes. Así, la calidad del suelo significa mejorar los componentes físicos, químicos y biológicos del mismo.

2) Conocimiento del ambiente por aplicación operativa o práctica.

El conocimiento de la ciencia del suelo se ha desarrollado bastante y ha despertado el interés de muchos estudiosos y científicos. La dimensión ambiental incluye el estudio del recurso suelo, el cual está relacionado con otras disciplinas. A partir del conocimiento de un perfil de suelo, un edafólogo experimentado ve, describe e infiere acerca de las propiedades de un suelo y, hace interpretaciones sobre otras propiedades, cualidades y potencial productivo.

La aplicación práctica del conocimiento científico de la ciencia del suelo permite a los profesionales y técnicos de la Sociedad Peruana de la Ciencia del Suelo, INIA y PNIA a desarrollar labores sobre este recurso usando el análisis holístico. Sumado a esto, los hombres que trabajan en el campo (técnicos) tienen conocimientos muy completos del ecosistema que les rodea y de las relaciones entre el ambiente y su propia cultura. Concretamente, los conocimientos científicos son abstractos, mientras que la práctica de dichos conocimientos es más completa.

3) Conocimiento del ambiente y desarrollo sostenible por vivencia ordinaria

En el caso de los suelos, las grandes civilizaciones mesoamericanas, para poder mantenerse, necesitaron un sector agrícola altamente productivo, el conocimiento indígena sobre el

ambiente fue sistemático y variado. Algunos autores (Queiroz y Norton, 1992) indicaron la superioridad del conocimiento científico de los suelos, mientras que otros afirman que el conocimiento tradicional del suelo se heredó del prehispánico y se fue adquiriendo en forma oral, de padres a hijos, sin requerir de una validación continua, de forma que este conocimiento tradicional armoniza con todos los aspectos de la vida.

La percepción que tienen los miembros de la sociedad, es decir los agricultores de Huánuco sobre el ambiente es limitada. Los cultivos de cacao presentan baja calidad, por las elevadas concentraciones de Cd en las semillas. Ante dicho problema, los productores no encuentran solución hasta el momento. La concepción del medio ambiente es limitada para los agricultores, gran parte de ellos no cuentan con estudios y carecen de cultura.

CAPITULO 3

Experiencias de manejo de metales pesados en invernadero y campo

3.1. Ámbito, población, muestra y diseño experimental

El trabajo experimental se realizó en dos etapas. Una primera etapa en condiciones de invernadero. Este tuvo como fin establecer las bases del experimento para campo definitivo, para lo cual se implementaron los tratamientos en maceteros o tiestos. Se utilizó como planta indicadora, al cultivo del pimiento. El lugar de trabajo en esta primera etapa fue en el laboratorio de la Universidad Autónoma de Madrid, España. La latitud norte es 40° 32' 43" y longitud oeste 3° 41' 46", a una altura de 657⁶ msnm, con rangos de temperatura entre 13°C y 35°C y, una humedad de 79%.

Se utilizó suelos contaminados con metales pesados (Cadmio y Plomo) con cultivo de papa como antecesor, se buscó probar varias alternativas para inmovilizar metales pesados en este suelo. Las plantas de pimiento tenían un mes de edad antes de ser usadas en la experimentación. La población fue 24 plantas de pimiento instalados cada uno en un macetero o tiesto y bajo condiciones ambientales controladas. El sustrato con cada macetero fue también una unidad experimental, por lo tanto, se tuvo 24 suelos donde se hicieron las distintas evaluaciones y determinaciones. El número de la muestra fue igual al de la población, es decir la totalidad de plantas (24 plantas) y suelos (24 macetas) fueron tomados para este estudio. El tipo de muestreo en este caso fue no probabilístico en la forma de muestreo intencional o por conveniencia porque toda la población fue seleccionada como parte de la muestra. La unidad de análisis fue cada tiesto con una planta de pimiento. El diseño experimental fue en DCA. Se testeó seis tratamientos con cuatro repeticiones, haciendo un total de 24 unidades experimentales.

La segunda etapa consistió en un experimento en campo, instalado en la localidad de Huamancoto, Pumahuasi. Su ubicación política fue región Huánuco, provincia de Leoncio Prado, distrito Daniel Alomía Robles, localidad de Huamancoto, Pumahuasi. El cultivo indicador para esta etapa de estudios fue el cultivo de cacao variedad CCN-51 que tenían entre 8 y 10 años de edad. La latitud sur es de 09° 11' 18", longitud oeste de 75° 57' 17", a una altitud de 667 msnm. La temperatura promedio en Huamancoto es de 23°C, precipitación promedio anual es de 3200 mm. La población estuvo conformada por 18 plantas de cacao, variedad CCN-51 entre 8 y 10 años de edad, cada planta con el suelo ubicado alrededor de la copa. La muestra estuvo conformada por la totalidad de la población (18 plantas) de cacao tomadas al azar dentro de cada parcela más el suelo que corresponde alrededor de la copa de cada planta. El tipo de muestreo fue probabilístico en la forma de MAS porque cualquiera de las plantas de cacao, en el momento de la instalación del experimento tuvieron la misma probabilidad de formar parte de la muestra. La unidad de análisis fue cada parcela con las plantas de cacao y

suelo alrededor de la copa de cada planta. El diseño experimental fue en DBCA con seis tratamientos y tres repeticiones, haciendo un total de 18 unidades de análisis

3.2. Nivel y tipo de estudio

El nivel de investigación fue experimental, porque se manipuló la variable independiente tratamientos con métodos físico-químicos y biológicos y, se midió su efecto sobre las variables dependientes concentración de Cd en plantas de pimiento y granos de cacao y, en el suelo y, asimismo se comparó con un testigo absoluto sin el agregado de ningún tratamiento, tanto en invernadero y campo.

El tipo de la investigación fue Aplicada, porque se recurrió a los conocimientos pre constituidos de las ciencias del suelo y ciencias bioquímicas para solucionar el problema de contaminación de suelos con metales pesados y evitar la absorción de metales pesados por las plantas y, su posterior acumulación en los órganos cosechables.

a. validación de los instrumentos

El nivel de investigación fue experimental y el tipo de investigación Aplicada, donde se usaron como instrumentos estándares a la estadística paramétrica. Algunas herramientas estadísticas usadas en este estudio fueron Análisis de Varianza (ANOVA), prueba LSD, regresión lineal, Análisis de Componentes Principales y correlación de Pearson.

Por otro lado, los protocolos de laboratorio usados para el análisis de concentración de metales pesados en suelos y plantas se fundamenta en el trabajo realizado por expertos y descritos en la norma española UNE 77322, el cual norma para la extracción de elementos traza usando agua regia, si el porcentaje de Carbono Orgánico es mayor a 20%, se le trata con adición de ácido nítrico. El proceso de digestión sirve para determinar los elementos traza usando espectrofotometría atómica convenientes (AENOR, 2003). Luego del pre tratamiento de muestras de suelo establecido en la norma 77322 (AENOR, 1997), se empieza la extracción de los elementos traza dejando en reposo las mezclas con los ácidos clorhídrico y nítrico a temperatura ambiente. Seguido se realiza la ebullición, luego se filtra el extracto y se enraza a cierto volumen.

b. confiabilidad de los instrumentos

La estadística inferencial usada en este estudio fue paramétrica, los cuales son fáciles de aplicar, son útiles a un nivel de significancia previamente especificado. Para la inferencia paramétrica solo se requiere como mínimo una escala de intervalo y los resultados son fáciles de interpretar. Las fuentes sistemáticas de error no tienen impacto adverso sobre la confiabilidad de la estadística paramétrica, porque no afectan de manera constante y no llevan inconsistencia. En contraste, el error aleatorio produce inconsistencia, lo que conduce a menor confiabilidad.

3.3. Procedimientos

3.3.1. Procedimiento en la fase de invernadero

Se pesaron 5 kg de suelo contaminado proveniente de una parcela con cultivo de papa, de la localidad de Almería, España. Luego se mezclaron uniformemente con las enmiendas de los tratamientos que corresponde a cada macetero (**Figura 01**). Luego se sembraron en cada maceta con una planta de pimiento de 1,5 meses de edad (**Figuras 02 y 03**), de acuerdo a los tratamientos propuestos se ubicaron. El riego estuvo controlado, así como el ambiente en invernadero.



Figura 01: Sistema de riego del experimento.



Figura 02: Sondas Ryzon colocados en cada macetero para extracción del agua capilar.



Figura 03: Sistema de interacción planta-tratamientos en maceteros

Manejo del experimento

a. Análisis de suelo

El suelo para el ensayo fue recolectado en la comunidad autónoma de Murcia, España. Este suelo tenía un uso agrícola y se utilizaba para la producción de papa sin aplicación de ningún fertilizante ácido para evitar movilizaciones de metales pesados. Las características se detallan en la **Tabla 01**.

Tabla 01: Características granulométricas, salinidad, reacción, materia orgánica y nutrientes del suelo problema.

Granulometría			
<i>Textura</i>	Franco-arcillo-arenosa	<i>Densidad aparente</i>	1,434 g/cc
Salinidad			
<i>Conductividad elec. 25°C ext. Acuoso 1/5 (p/v)</i>	0,449 mS/cm	<i>Sulfato sol. En extracto acuoso 1/5 (p/v)</i>	0,087 % (p/p)
<i>Cloruro sol. En extracto acuoso 1/5 (v/v)</i>	0,52 meq/100 g	<i>Sodio asimilable</i>	1,83 meq/100 g
Reacción del suelo			
<i>pH en KCl 1 M extracto 1/2 (v/v)</i>	7,34	<i>Caliza total</i>	5,01 % (p/p)
		<i>Caliza activa</i>	1,006 % (p/p)
Materia Orgánica			
<i>MO total</i>	1,69 % (p/p)	<i>C/N</i>	8,9
<i>C orgánico total</i>	0,979 % (p/p)		
Macronutrientes			
<i>N total</i>	0,110 % p/p	<i>Fósforo asimilable</i>	84 mg/kg
<i>Nitrógeno nítrico sol.ext en ext. Acuoso 1/5 (p/V)</i>	27,6 mg/Kg	<i>Potasio asimilable</i>	1,42 meq/100 g
<i>Calcio asimilable</i>	10,8 meq/100 g	<i>Magnesio asimilable</i>	5,4 meq/100 g
Micronutrientes			
<i>Hierro asimilable</i>	4,67 mg/kg	<i>Cobre asimilable</i>	2,04 mg/Kg
<i>Manganeso asimilable</i>	23,5 mg/Kg	<i>Boro asimilable</i>	0,31 mg/Kg
<i>Zinc asimilable</i>	28,1 mg/Kg		

Fuente: Resultados del Laboratorio de Bromatología de la UAM.

Analizando las propiedades del suelo se puede observar que, aunque algunos valores son un poco altos como los de cationes de potasio, sodio, manganeso y zinc asimilables; en general el resto de valores del suelo son bajos. El hecho de que el origen de este suelo sea agrícola supone que se trata de un suelo bastante agotado (un ejemplo son los valores del apartado de materia orgánica que están todos por debajo de los valores normales y deseables).

c. Siembra

Se colocaron una planta de pimiento de 1,5 meses de edad en cada maceta de 5 kg de capacidad. Los tratamientos fueron seis repetidos 4 veces (biochar, disolución nutritiva+biochar, humato, humato+biochar, disolución nutritiva, testigo absoluto).

d. Labores culturales

Se realizaron las labores culturales necesarias en el cultivo como son remociones periódicas del suelo para evitar la compactación de los suelos en la parte superior del macetero así como control de malezas, con la finalidad de mantener los cultivos libre de la competencia con las malezas.

e. Riegos

Los riegos fueron periódicos, de acuerdo a la necesidad de los cultivos y manteniendo las macetas en capacidad de campo. El sistema de riego fue controlado (1 L por día), así como la temperatura (20°C) y humedad ambiental estuvieron controlados.

f. Control fitosanitario

No fue necesaria realizar aplicaciones de agroquímicos por la ausencia de plagas y enfermedades durante el ciclo de cultivo.

g. Cosecha

La cosecha se efectuó manualmente cuando el cultivo finalizó su crecimiento y empezó la fase de reproducción. Esto ocurrió 3 meses después de instalado el experimento. Se tomaron hojas de la parte media de la planta de pimiento, luego se secaron y se molieron finamente. Los tallos tomados fueron la totalidad del tallo que presentó cada planta, se secó hasta peso constante en estufa a 40°C y se molieron. Los frutos tomados fueron la totalidad de frutos que presentó cada planta, también se colocaron en bolsas de papel, se secaron hasta que alcanzaron peso constante y luego se molieron. Las muestras molidas del material vegetal fueron guardadas luego en bolsas pequeñas debidamente rotuladas. En el caso del suelo, se tomaron muestras de 200 g cada maceta, se secaron y se tamizaron a 2 mm de diámetro de tamiz para luego hacer las distintas determinaciones en laboratorio.

Parámetros evaluados en el experimento en invernadero

Se evaluaron los siguientes parámetros.

a. Concentración de clorofila [ChI] en hojas con un medidor portátil SPAD

Se midió la concentración de clorofila en las hojas del pimiento, usando un medidor portátil SPAD, se tomó el promedio de tres lecturas de tres hojas diferentes. Las hojas tomadas fueron de la parte media de la planta.

b. Peso de hojas, tallos y frutos

Se pesaron las hojas, tallos y frutos por separado de cada unidad experimental, esto con el fin de conocer el desarrollo de las plantas con los distintos tratamientos.

c. Concentración de Cd y Pb en agua de poro

Se tomaron el agua capilar o agua de poro de cada planta tomado con las sondas Ryzon. En cada muestra se hicieron las mediciones de concentración de Cd y Pb con Espectrofotómetro ICP-MASA con vista axial (Spectro-Arco).

d. Concentración de Cd y Pb en el suelo al final del ensayo

Se tomaron muestras del suelo de cada macetero y se realizaron las extracciones usando agua regia (9 ml de HCl 35% + 3 ml HNO₃ 69%). Para lo cual se pesó 0,25 g de muestra de suelo ± 0,5 g en tubos de ensayo se colocaron con agua regia, después de 15 minutos de reposo se llevó a microondas para empezar la digestión (previamente se calibró para que en 15 minutos llegue a 1200 W=200°C y dejar a esa temperatura por 40 minutos). Una vez digestados las muestras el contenido se colocó en fiolas de 50 mL usando papel filtro y embudos pequeños para evitar que restos de suelo pase. Para finalmente enrasar a 50 mL y, ser llevados en tubos falcon de 50 mL de capacidad para ser llevados a tomar las lecturas en espectrofotómetro ICP-MASA con vista axial.

e. Concentración de Cd y Pb en hojas de pimiento

Se tomaron muestras de hojas de cada macetero y se secaron hasta peso constante en una estufa a 40°C. Tanto en hojas y frutos se hizo una digestión ácida-oxidante a alta presión. La digestión ácida se realiza bajo presión en frasco cerrado y en el interior de autoclave. El material vegetal se muele en un mortero, el polvo se guardó en bolsas con cierre tipo zip. Se pasaron 0,25 g de material vegetal seco y se pasaron a los frascos y se añadieron 4 mL de H₂O mili-Q; 1,5 mL de HNO₃ y 1 mL de H₂O₂. La digestión se realizó en autoclave a 125°C y 1,5 KPa durante 30 minutos (Lozano-Rodriguez y col, 1995). La muestra se almacenó en tubos falcon para luego ser llevado a lecturas en espectrofotómetro ICP-MASA con vista axial.

f. Concentración de Cd y Pb en frutos de pimiento

Se tomaron muestras de frutos de pimiento de cada macetero y se llevaron a estufa a 40°C hasta que alcanzaron peso constante. Luego se molieron para que en esas muestras se realice la digestión ácida-oxidante a alta presión siguiendo el mismo procedimiento que para el caso de hojas.

3.3.2. Procedimiento en la fase de campo

a. Diagnóstico inicial

Antes de la instalación de los experimentos en campo, se realizó un diagnóstico del estado de contaminación de los suelos y cultivos de cacao. Los resultados indicaron que tanto en profundidades de 0-30 y 30-60 cm, el Cd total y Cd disponible presentaron bajos valores de concentración en el suelo, por debajo del límite máximo permisible propuesto por el MINAM que es 1,46 ppm (**Tabla 02**). Sin embargo el Cd en granos de cacao fue alto, por encima del límite máximo permisible propuesto por la Unión Europea, el cual es de 0,05 ppm (**Tabla 03**).

Tabla 02: Características iniciales del suelo con cultivo de cacao, elaborado con datos de Villanueva (2020).

Profundidad (cm)	Variable	Media (ppm)	D.E.	Var (n-1)	CV	Min	Máx	Mediana
0-30	Cd Total	0,79	0,02	0,00	2,48	0,77	0,82	0,79
0-30	Cd disponible	0,10	0,01	0,00	13,49	0,08	0,12	0,10
30-60	Cd Total	0,78	0,03	0,00	3,99	0,74	0,81	0,79
30-60	Cd disponible	0,10	0,01	0,00	10,63	0,09	0,11	0,09

Tabla 03: Concentración de Cadmio en órganos vegetativos del cultivo de cacao, elaborado con datos de Villanueva (2020).

Órgano	Media (ppm)	D.E.	Var (n-1)	CV	Min	Máx	Mediana
Grano	1,07	0,11	0,01	10,72	0,92	1,19	1,09
Hoja	1,39	0,09	0,01	6,61	1,31	1,49	1,39
Hojarasca	1,19	0,15	0,02	12,97	1,02	1,39	1,17

Según este trabajo, los resultados del análisis de dinámica del Cd en el sistema suelo-planta en la misma parcela de este experimento, el modelo matemático que dio mejor ajuste fue:

$Cd_{Grano} = -7,61 + 2,55Cd_{Hoja} + 1,34Cd_{Hojarasca}$, el coeficiente de determinación fue de $R^2_{Aj} = 0,99$ (Tabla 04).

Los resultados obtenidos por Villanueva (2020) sugieren que, si existe mayor contenido de Cd en hojas, existe mayor acumulación de este elemento en granos. Lo cual es razonable porque el proceso de transporte y acumulación de los fotosintatos en los órganos cosechables proviene principalmente de las hojas. Las hojarasca también aportan Cd a los granos, lo que sugiere que el Cd se recicla de los rastrojos y se acumula en los granos a partir de las bajas concentraciones que existen en el suelo.

Tabla 04: Análisis de regresión parcial de la concentración de Cadmio en los granos de cacao, respecto a las concentraciones del Cd en las hojas funcionales y hojarasca (Villanueva, 2020).

variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP	AIC	BIC
Cd G (ppm)	12	0,99	0,99	5,60	-62,5	-60,08

Coeficiente	Est	E.E	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor	CpMallows	VIF
Constante	-7,61	2,62	-13,66	-1,57	-2,9	0,0198		
CdH* (ppm)	2,55	4,30	1,56	3,54	6	4,00	3,43	7,05
CdHo** (ppm)	1,34	0,09	1,13	1,56	14,55	<0,0001	191,41	2,82

*CdH: Concentración de Cadmio en hoja

**CdHo: Concentración de Cadmio en hojarasca

b. Instalación del experimento

Los experimentos en campo se instalaron en octubre del año 2018. Los cultivos de cacao fueron manejados de forma orgánica, la variedad del cultivo de cacao fue CCN-51. La edad del cultivo fue de 8 a 10 años de edad. Para el caso del biochar, se aplicó al 10% y 20% de concentración, lo cual significa que se agregó 10 g biochar por kg de suelo y 20 g de biochar por kg de suelo respectivamente. Esto llevado al peso de la capa arable del suelo, se aplicó alrededor de la copa de la planta mezclando el biochar hasta los 20 cm de profundidad. Para el tratamiento con micorrizas, se inoculó cepas de micorriza en cada planta de cacao alrededor de las raíces. Para el caso del tratamiento con bioarremediador *Commelina sp*, se sembró plántulas de dicho cultivo alrededor de cada planta de cacao para propiciar a la biorremediación del cadmio en las plantas fitoextractores.

El tiempo de interacción para las plantas y los tratamientos fue de 6 meses, es decir hasta agosto del 2019. Para luego realizar las determinaciones de las distintas variables.

b.1. Labores culturales

Se realizaron las remociones en forma periódica para evitar compactaciones del suelo, eliminando la competencia con las malezas.

b.2. Riegos

El cultivo en campo no se realizó con riego, sino con la lluvia natural.

b.3. Control fitosanitario

No fue necesaria realizar aplicaciones de agroquímicos por la ausencia de plagas y enfermedades durante el ciclo de cultivo.

b.4. Cosecha

La cosecha se efectuó manualmente cuando pasó 6 meses del efecto de los tratamientos. Se extrajeron muestras de hojas y granos de cacao. La toma de muestras de suelo fue de alrededor de la copa del árbol de cacao y de 0-20 cm de profundidad, para luego secarlo en sombra y tamizar con tamiz de 2 mm de diámetro. Las hojas y granos se tomaron manualmente, las hojas de la parte media del canopeo, los granos de los frutos representativos de la parte media del árbol. Se secaron y se molieron con un molinillo de mano, para luego ser analizados en laboratorio.

Parámetros evaluados en la fase de campo

Se realizaron las siguientes determinaciones:

a. Concentración de Cd total y Cd disponible en el suelo

El Cd total se determinó con el método de EPA-3050B (Agencia de Protección Ambiental) mediante digestión ácida. Para lo cual, se pesó 2 g de suelo tamizado a 2 mm de tamiz, se añadió 10 ml de HNO₃ 1:1, se calentó a 95°C por 5 minutos. Luego se dejó enfriar y se añadió 2 ml de agua destilada y 3 ml de H₂O₂. Cuando terminó de efervescer se añadió 1 ml de H₂O₂. Se repitió este último procedimiento hasta que termine de efervescer. Luego se añadió 5 ml de HCl concentrado y 10 ml de agua desionizada. Se calentó por 15 minutos y dejó enfriar, luego se filtró y se aforó a 50 ml con agua destilada. Finalmente, la cuantificación del extracto se realizó con el ICP OES (espectrofotómetro de emisión atómica).

El Cd disponible se extrajo con solución de EDTA 0,05M. Para lo cual, en 5 g de suelo se agregó 20 ml de solución de EDTA 0,05M, se dejó reaccionar por 2 horas agitando. Luego se filtraron con filtro Whatman N° 542 y se determinó el Cd disponible con ICP OES (espectrofotómetro de emisión atómica).

b. Concentración de Cd en granos de cacao

La determinación del Cd en granos de cacao siguió el siguiente procedimiento. Se pesaron 500 mg de muestra de hoja o grano según sea el caso, se dejó digerir con 10 ml de una mezcla de HNO₃ (65%) y HCl (98%) en una proporción de 4:1 respectivamente. La digestión se realizó en un bloque a 120°C durante 3 horas, luego a 200°C durante 2 horas, la solución digerida se filtró con tamiz Whatman N° 42 y se diluyó antes de la lectura a 50 ml con agua destilada. La concentración de Cd en los extractos se realizó con ICP OES (espectrofotómetro de emisión atómica).

3.3.3. Tratamientos en estudio

Tratamientos en condiciones de invernadero

Se instalaron macetas con suelos contaminados y plantas de pimiento (**Figura 04**). Esto con el fin de evaluar la movilidad de los metales pesados en un suelo muy contaminado, tras la adición de los distintos tratamientos. Se observó la capacidad de interacción de los tratamientos con los metales contaminantes. El sistema fue completo (suelo en interacción con plantas de pimiento de 1,5 meses de edad). Para la extracción de la disolución del suelo (agua de poro) se utilizaron sondas ryzon. El riego fue automatizado. Cada macetero tenía capacidad para 5 kg de suelo contaminado.

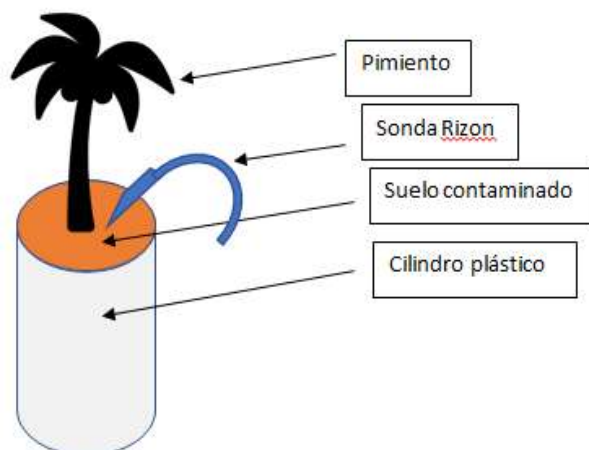


Figura 04 : Sistema de interacción planta – metales pesados en el suelo

Los tratamientos estudiados en este contexto se detallan en la siguiente tabla.

Tabla 05: Detalle de tratamientos en etapa de invernadero con cultivo de pimiento

N°	Tratamientos	Concentración
T1	Biochar 5%	50 g de biochar por kg de suelo
T2	Disolución nutritiva + Biochar	Solución A= 5 ml/L Solución B= 5 ml/L Micronutrientes= 10ml/L 50 g de biochar por kg de suelo
T3	Humato	20 g de humato por kg de suelo
T4	Humato + Biochar	20 g de humato por kg de suelo 50 g de biochar por kg de suelo
T5	Disolución nutritiva	Solución A= 5 ml/L Solución B= 5 ml/L Micronutrientes= 10ml/L
T6	Control	-----

Tratamientos en condiciones de campo

A nivel de campo definitivo, se estudiaron en cultivos establecidos de cacao variedad CCN-51 que tenían entre 8 y 10 años de edad. En una primera etapa, se realizó un diagnóstico de campo para conocer el nivel de contaminación de los suelos. Luego se instalaron los tratamientos.

Tabla 06: Detalle de tratamientos en etapa de campo con cultivo de cacao

	Tratamiento	Concentración	Densidad de siembra
T1	Control	-----	-----
Tratamiento físicoquímico			
T2	Biochar al 1%	10 g biochar/kg de suelo	-----
T3	Biochar al 2%	20 g biochar/kg de suelo	-----
Métodos biológicos			
T4	Comelina (<i>Callisia repens</i>)	-----	1 planta/0,1m ²
T5	Micorrizas arbusculares (HMA)	-----	1 planta/0,1m ²
T6	Comelina + HMA	-----	1 planta/0,1m ²

3.4. Tabulación

Las tablas que contienen los resultados del análisis estadístico, muestran los obtenidos por la estadística inferencia paramétrica de cada variable, indicando los tratamientos y la diferencia estadística.

3.5. Análisis de datos

Para el análisis estadístico se usó la estadística inferencial. Las diferencias observables entre los tratamientos de las variables en estudio se realizaron el análisis de varianza (ANOVA) para cada variable observada. Para comparar los tratamientos se usó el estadístico LSD al 0,05 de nivel de significación. Se usó el programa estadístico *infostat* versión 2018. Las tablas y figuras de los resultados muestran las medias de las variables obtenidas por los tratamientos, las barras son el error estándar. Se usó también análisis de regresión lineal, análisis de componentes principales y correlación de Pearson.

Para el procesamiento de los datos se utilizó el programa estadístico Statistix y Table Curve. La presentación de los datos fue en tablas analizadas estadísticamente representada en figuras de barras, de dispersión y otros. Para representar las figuras y tablas se usó el programa Graph prism.

3.6. Análisis descriptivo de los resultados

En la fase de invernadero, se realizó un experimento en maceteros con cultivo de pimiento, usando seis tratamientos para reducir la movilidad de metales pesados como Cadmio y Plomo en el suelo, así evitar la absorción por las plantas. Los tratamientos en maceteros se repitieron 4 veces para cada tratamiento. Los tratamientos fueron con Biochar(5%), disolución nutritiva+biochar, humato, humato+biochar, disolución nutritiva y el Control sin agregar nada. El biochar junto con una buena nutrición vegetal usando humatos (humato+biochar) resultó en bajas concentraciones de Cd en frutos y hojas de pimiento. Esto es atribuible a que en situaciones de limitación de nutrientes, las plantas segregan ácidos orgánicos que ayudan a movilizar más los elementos químicos que encuentran en el suelo, mientras que si las plantas

están bien nutridas, no se emite estos ácidos orgánicos y con la ayuda del biochar como quelante de metales pesados, se reduce la absorción de dichos metales por el cultivo. El Control presentó mayores contenidos de Cd y Pb en el agua capilar extraído con sondas ryzon. En la fase de campo, se hizo un experimento con el cultivo de cacao variedad CCN-51 entre 8 y 10 años de edad en la zona de Pumahuasi, Tingo María. Se agregó 6 tratamientos al suelo, un Control absoluto, Biochar al 1%, Biochar al 2%, Commelina (plantas biorremediadoras), HMA (micorrizas arbusculares) y Commelina+HMA. Estos tratamientos se repitieron 3 veces, haciendo un total de 18 plantas de cacao tratadas alrededor de la copa de cada árbol. Se dejó un tiempo de 6 meses para que se produzca la interacción de los tratamientos en el sistema suelo-planta. Los resultados evidenciaron que el contenido de Cd en granos de cacao es menor con los tratamientos con HMA y Commelina+HMA, esto puede atribuirse a la capacidad de encapsular los metales pesados que tienen los hongos que causan micorrizas, sumado al efecto bioabsorbente de la Commelina que puede reducir la disponibilidad de metales pesados en el suelo.

El análisis descriptivo de las variables determinadas en ambos experimentos se presenta en la **Tabla 07**. La media de cada variable representa al promedio de todos los tratamientos, el rango es el valor mínimo y el valor máximo de los datos de cada variable que se muestra, el rango intercuartil (50% de los datos) son los valores que están entre el Q1 y Q3. El coeficiente de variación representa la dispersión relativa del conjunto de datos de cada variable expresado en %, el error estándar es la desviación estándar de la distribución muestral de cada variable medido en el experimento en invernadero y en campo.

Tabla 07: Medidas de resumen de las variables medidas en suelo y planta en el experimento en invernadero y en campo definitivo.

Variable	N	Media	D.E.	E.E	CV	Min	Máx	Mediana	Q1	Q3
Resultados de la fase de invernadero (cultivo de pimiento)										
Cd total en suelo (mg kg ⁻¹)	24	17,8	3,57	0,84	19,9	12,5	23,2	18,1	14,3	20,4
Cd en agua de poro (mg kg ⁻¹)	24	0,008	0,009	0,002	105,6	0,0004	0,03	0,004	0,002	0,013
Cd en hojas (mg kg ⁻¹)	24	6,59	2,99	0,62	45,3	2,75	12,5	5,75	4,16	8,50
Cd en frutos (mg kg ⁻¹)	21	1,65	1,56	0,55	95,06	0,41	5,03	1,08	0,41	1,70
Pb total en suelo (mg kg ⁻¹)	24	7549,1	424,4	100,05	5,62	6665,1	8227,1	7560,1	7359,8	7811,2
Pb en agua de poro (mg kg ⁻¹)	24	0,01	0,01	0,005	121,9	0,0005	0,06	0,007	0,001	0,027
Pb en hojas (mg kg ⁻¹)	24	2,24	0,77	0,16	34,5	1,18	4,03	2,23	1,60	2,47
Pb en frutos (mg kg ⁻¹)	21	0,08	0,07	0,02	91,45	0,001	0,23	0,05	0,01	0,13
Conc. Clorofila (ug	24	33,96	9,10	1,89	26,80	18,20	45,10	37,10	23,50	40,60

cm ⁻²)										
Peso de hojas (g)	24	43,25	17,60	3,67	40,7	16,2	72	49	21,1	55,9
Peso de tallo (g)	24	26,7	7,38	1,54	27,5	14,6	38,5	28,5	20,7	32,7
Peso de frutos (g)	24	16,6	26,9	5,60	161,4	0,0	79,9	0,0	0,0	42,3

Resultados de la fase de campo (cultivo de cacao)										
Cd total (mg kg ⁻¹)	18	0,60	0,04	0,01	6,42	0,54	0,69	0,60	0,57	0,62
Cd disponible (mg kg ⁻¹)	18	0,21	0,04	0,01	17,7	0,16	0,28	0,21	0,19	0,23
Cd en grano (mg kg ⁻¹)	18	0,81	0,14	0,03	17,4	0,57	1,03	0,83	0,74	0,93

3.7. Análisis inferencial de resultados y contrastación de hipótesis

3.7.1. Resultados de la fase de invernadero

La fase de experimentación en invernadero tuvo una duración de 3 meses. En el experimento realizado en invernadero utilizando como planta indicadora al cultivo de pimiento, se obtuvieron los siguientes resultados.

a. Concentración de clorofila en hojas medido con medidor portátil (SPAD)

Se midió la concentración de clorofila en hojas del cultivo de pimiento, para lo cual se usó el sensor portátil SPAD. El fin de esta determinación fue evaluar el desarrollo de las plantas (producción de clorofila) en condiciones de suelos contaminados con metales pesados sumado al efecto de los distintos tratamientos. Los resultados son el promedio de tres lecturas en distintas hojas de la misma planta.

Los resultados del análisis de varianza (**Tabla 08**) indicaron que la concentración de clorofila fue distinta entre los tratamientos (p-valor<0,01). Los tratamientos que desarrollaron mayor clorofila fueron con humato, humato+biochar, disolución nutritiva+biochar y disolución nutritiva; mientras que el Control y Biochar produjeron menos clorofila (**Figura 05**).

Tabla 08: Análisis de varianza para concentración de clorofila, valor-p para tratamientos y repeticiones.

Fuente de variación	SC	GI	CM	F	p-valor
Tratamiento	1641,17	5	328,23	30,45	<0,01
Error	183,23	17	10,78		
Total	1824,41	22			

C. V. = 9,66

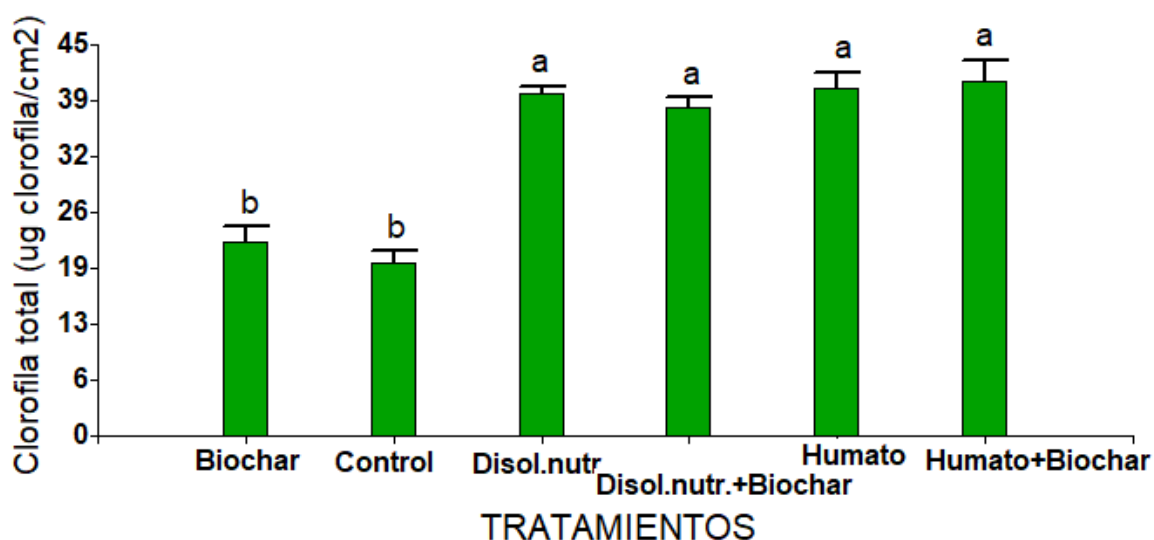


Figura 05: Diferencia de concentración de clorofila entre los tratamientos con la prueba LSD. Los cambios de letra indican diferencia significativa al nivel de significación del 0,05

b. Peso de hojas, tallos y frutos

Los resultados del ANOVA para el peso de hojas (p-valor<0,01), peso de tallos (p-valor<0,01) y peso de frutos (p-valor=0,58) se muestran en la **Tabla 09**. La diferencia en peso de los distintos órganos (hojas, tallos y frutos) se muestra en la **Figura 06**. Los mismos tratamientos que produjeron más clorofila (**Figura 05**) también presentaron mayor peso de hojas, lo mismo se vio para el peso de tallos; mientras que no hubo diferencia significativa para el peso de los frutos, en el caso del tratamiento con Disolución nutritiva+Biochar no presentó frutos hasta el término del experimento (**Figura 06**).

Tabla 09: Análisis de varianza de peso de hojas, tallos y frutos de pimiento

ANOVA			
Fuentes de variación	Peso hojas	Peso de tallos	Peso de frutos
Tratamientos (p-valor)	<0,01	<0,01	0,56
Valor F	21,53	7,08	0,79
C. V.	17,10	17,88	165,36

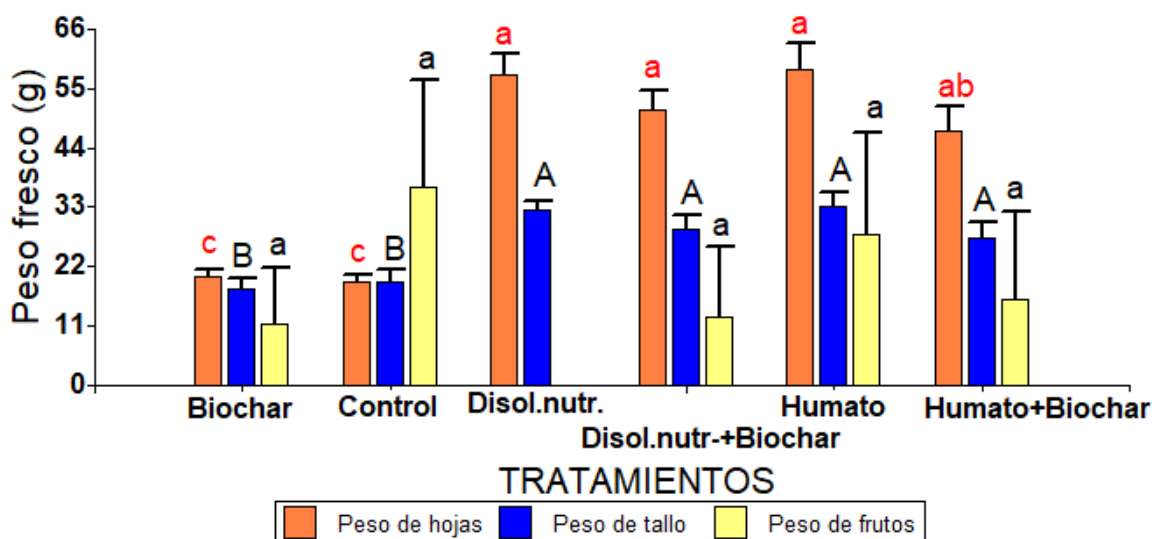


Figura 06: Prueba LSD y diferencia de peso de hojas, tallo y frutos entre los tratamientos. Los cambios de letra indican diferencia significativa al nivel de significación del 0,05.

c. Concentración de Cd y Pb en agua de poro

El agua capilar o agua de poro extraído de la rizósfera de cada planta se analizó con el fin de conocer exactamente la concentración de metales pesados (Cd, y Pb) que están siendo absorbidos por las plantas de pimiento. La **Tabla 10** muestra en análisis de varianza para concentración de Cd y Pb en el agua de poro, el cual indica que existe diferencia significativa para ambas variables. La **Figura 07** muestra las diferencias de concentración de Cd y Pb entre los tratamientos, para la concentración de Cd en el agua de poro, sólo el tratamiento Control presentó los valores más altos, los demás tratamientos, todos presentaron bajas concentraciones de Cd en agua de poro. Para el caso de Pb en agua de poro, la más alta concentración presentó el tratamiento Control, seguido del tratamiento Humato+Biochar, luego los demás tratamientos presentaron bajas concentraciones de Pb en agua de poro.

Tabla 10: Análisis de varianza para concentración de Cd y Pb en el agua capilar (agua de poro)

ANOVA		
Fuentes de variación	[Cd] en agua capilar	[Pb] en agua capilar
Tratamientos (p-valor)	<0,01	<0,01
Valor F	11,11	90,48
C. V.	46,28	19,71

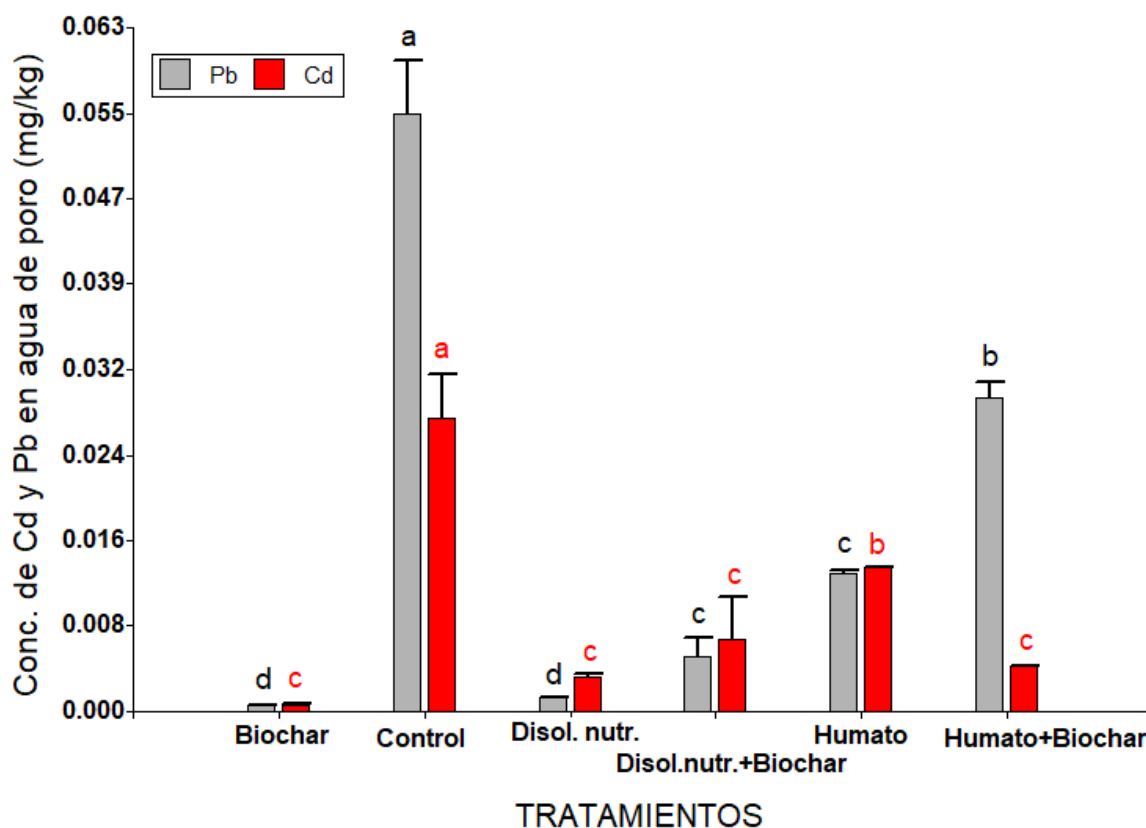


Figura 07: Prueba LSD y diferencia de concentración de Cd y Pb en el agua capilar de los tratamientos. Los cambios de letra indican diferencia significativa al nivel de significación del 0,05.

d. Concentración de Cd y Pb total en suelos, al final del ensayo

Los resultados del análisis de varianza para concentración de Cd y Pb en suelos, al final del ensayo se muestran en la **Tabla 11**, para ambas variables el p-valor fue $\leq 0,01$, lo que significa una alta diferencia significativa entre los tratamientos. Las **figura 08 y 09** muestra las diferencias entre los tratamientos para la concentración de Cd y Pb respectivamente. Los tratamientos con Biochar y Humato presentaron altas concentraciones de Cd total y, el tratamiento con Humato+Biochar el más bajo valor de Cd total en suelos, sugiriendo una interacción positiva entre el Humato y el Biochar. Para el caso de Pb total en suelos, los tratamientos con Humato+Biochar y disolución nutritiva presentaron los valores más bajos.

Tabla 11: Análisis de varianza de concentración de Cd y Pb total en suelos al final del ensayo

ANOVA		
Fuentes de variación	[Cd] total	[Pb] total
Tratamientos (p-valor)	<0,01	<0,01
Valor F	67,10	5,40
C. V.	4,42	3,71

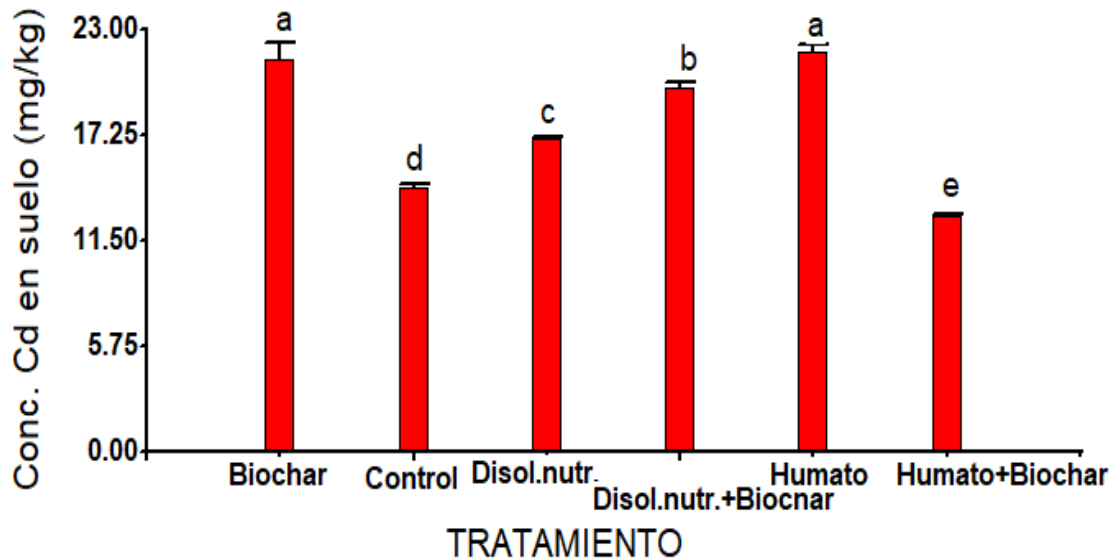


Figura 08: Prueba LSD y diferencia de concentración de Cd en el suelo al final del ensayo. Los cambios de letra indican diferencia significativa al nivel de significación del 0,05.

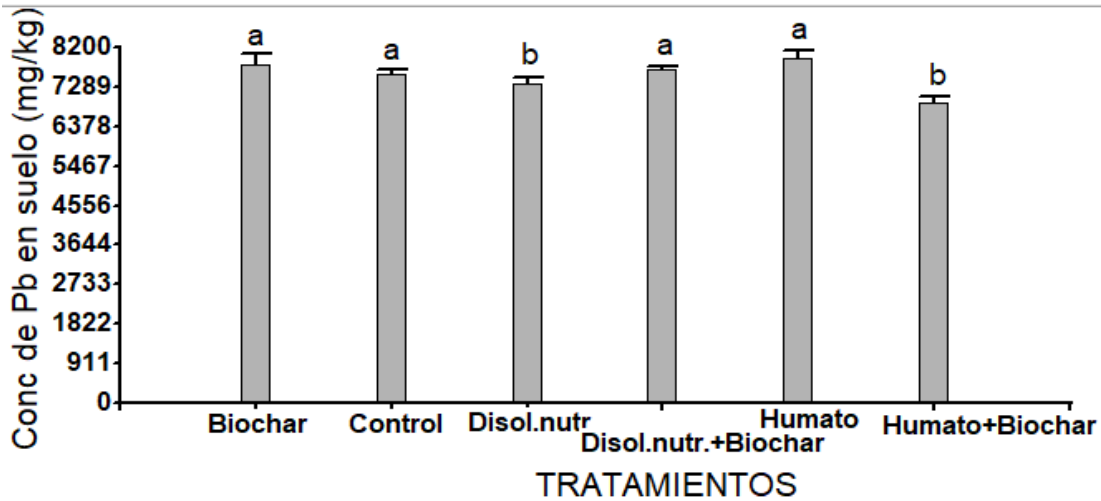


Figura 09: Prueba LSD y diferencia de concentración de Pb en el suelo al final del ensayo. Los cambios de letra indican diferencia significativa al nivel de significación del 0,05.

e. Concentración de Cd y Pb en hojas de pimiento

La **Tabla 12** muestra el análisis de varianza para concentración de Cd y Pb en hojas del cultivo de pimiento al final del ensayo, en ambos casos el efecto de los tratamientos fue altamente significativo. La **figura 10** muestra las diferencias de concentración de Cd y Pb entre los tratamientos. Sólo el tratamiento Control presentó las más altas concentraciones de Cd y Pb en hojas, mientras que el Humato+Biochar el valor más bajo de Cd y Pb en hojas.

Tabla 12: Análisis de varianza para concentración de Cd y Pb en hojas de pimiento

ANOVA		
Fuentes de variación	[Cd] en hojas	[Pb] en hojas
Tratamientos (p-valor)	<0,01	<0,01
Valor F	36,30	10,94
C. V.	15,11	19,14

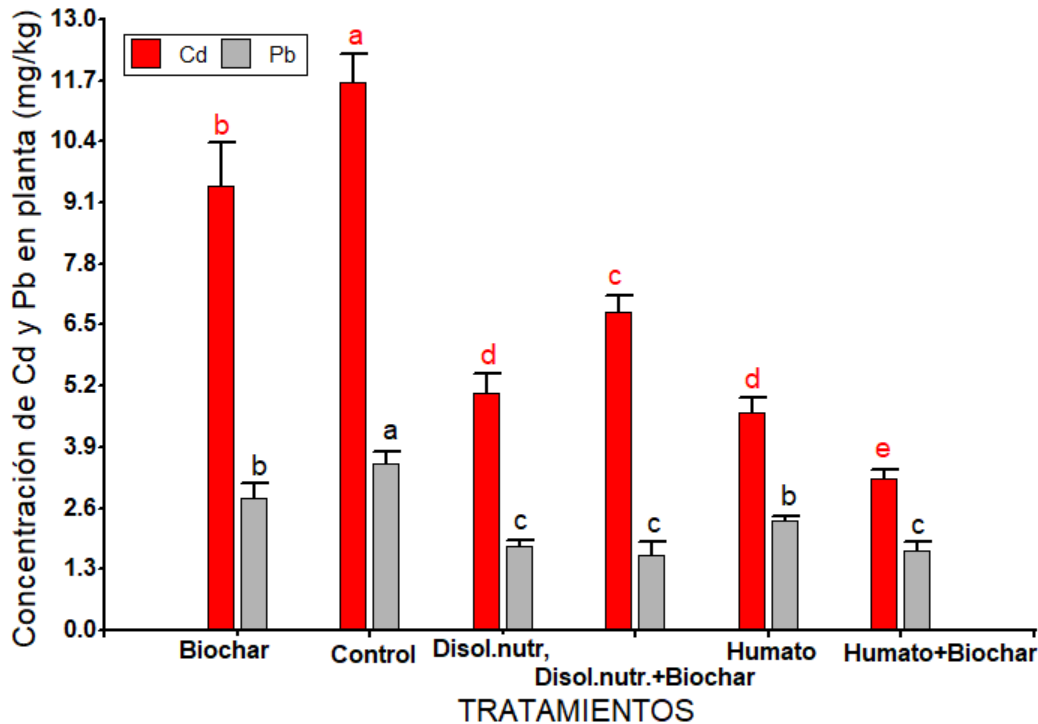


Figura 10: Prueba LSD y diferencias entre tratamientos para concentración de Cd y Pb en hojas de pimienta. Los cambios de letra indican diferencia significativa al nivel de significación del 0,05.

f. Concentración de Cd y Pb en frutos de pimienta

Al final del experimento, se vieron la formación de algunos frutos de pimienta. A los cuales se les determinó la concentración de Cd y Pb. Los resultados del análisis de varianza se muestran en la **Tabla 13**, para ambas variables no hubo diferencia significativa. La **Tabla 14** muestra las distintas concentraciones de Cd y Pb en los frutos de pimienta de los distintos tratamientos, que estadísticamente fueron iguales.

Tabla 13: Análisis de varianza para concentración de Cd y Pb en frutos de pimienta.

ANOVA		
Fuentes de variación	[Cd] en frutos	[Pb] en frutos
Tratamientos (p-valor)	0,14	0,22
Valor F	3,89	2,67
C. V.	58,40	65,45

Tabla 14: Concentración de Cd y Pb en frutos de pimienta

Tratamiento	[Cd] mg/kg	[Pb] mg/kg
Biochar	3,88a	0,19 a
Control	1,51 a	0,02 a
Disolución nutritiva	No hubo frutos frutos	
Disol.nutr+Biochar	0,87 a	0,02 a

Humato	0,57 a	0,11 a
Humato+Biochar	0,41 a	0,05 a

g. Relación entre la concentración de clorofila y peso de hojas

La concentración de clorofila en las hojas medido con sensor portátil SPAD estuvo estrechamente relacionado con el peso de las hojas (**Figura 11**, $r^2=0,75$). Esta relación fue positiva, es decir mientras más clorofila, mayor peso de hojas presentaron las plantas de pimiento. Además, se vio que los tratamientos Control y Biochar presentaron los valores más bajos de peso de hojas y concentración de clorofila, mientras que los tratamientos con humato y disolución nutritiva y, sus combinaciones presentaron mayor clorofila y mayor peso de hojas (**Figura 11**).

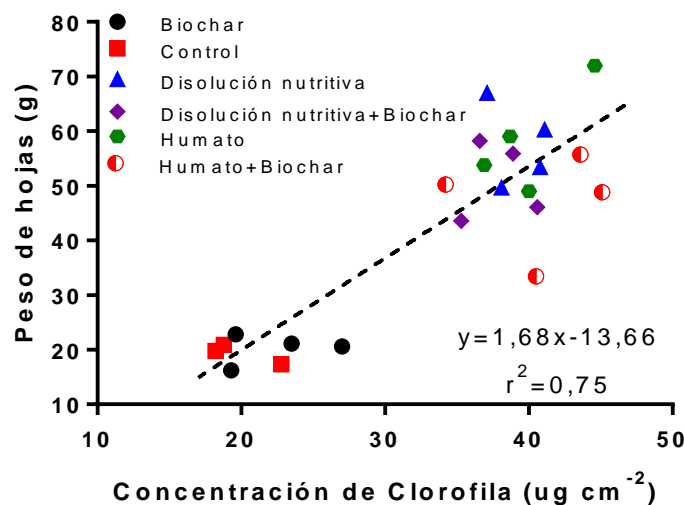


Figura 11: Relación entre la concentración de clorofila con SPAD y el peso de hojas.

h. Correlación entre la concentración de Cd y Pb del suelo, del agua de poro y de los órganos vegetativos de la planta

Los resultados de correlación entre la concentración de Cd y Pb en el suelo, en el agua de poro y en los órganos vegetativos de la planta (hoja y fruto) se muestran en la **Tabla 15**. El Cd de los frutos de pimiento con el Cd en las plantas guardó una relación positiva ($r^2=0,45$). El Cd de las plantas y el Cd del agua de poro y, el Cd en plantas con el Cd total en el suelo al final del ensayo guardaron relación positiva. Se vieron relaciones positivas entre el Pb en plantas con el Pb en el agua de poro ($r^2=0,56$). El Pb en plantas con el Pb en el suelo al final del ensayo se relacionaron también de forma positiva ($r^2=0,31$). El Pb en frutos con el Pb en plantas ($r^2=0,94$) también guardaron relación positiva. Por otro lado, la concentración de Clorofila de las hojas medidas con SPAD tuvo relaciones negativas con el Cd y Pb en frutos, en plantas, en agua de poro (**Tabla 15**).

Tabla 15: Coeficientes de correlación entre el Cd y Pb del suelo, del agua de poro y de órganos vegetativos y concentración de clorofila

Coeficientes de correlación

Correlación de Pearson: Coeficientes\probabilidades

	Cd en frutos	Cd en plantas	Cd Agua de poro	Pb en agua de poro	Pb en plantas	Pb en frutos	Pb en suelo final	conc clorofila	Cd suelo final
Cd en frutos	1.00000	0.26277	0.47756	0.41874	0.58720	0.03083	0.13570	0.16314	0.35305
Cd en plantas	0.45039	1.00000	0.07212	0.14654	0.00002	0.95543	0.19536	1.3E-08	0.88950
Cd Agua de poro	-0.32456	0.51436	1.00000	0.00092	0.00176	0.18222	0.94403	0.12953	0.32128
Pb en agua de poro	-0.36650	0.42611	0.80403	1.00000	0.04266	0.15540	0.28640	0.10457	0.00897
Pb en plantas	0.22793	0.76361	0.77758	0.56845	1.00000	0.94424	0.20999	0.00003	0.88647
Pb en frutos	0.75360	-0.02378	-0.56928	-0.59883	-0.02976	1.00000	0.01572	0.94645	0.08364
Pb en suelo final	0.57528	0.32008	-0.02165	-0.32005	0.31039	0.80591	1.00000	0.56438	0.00036
conc clorofila	-0.54425	-0.89010	-0.44297	-0.47063	-0.75248	-0.02858	-0.14557	1.00000	0.89131
Cd suelo final	0.38005	0.03527	-0.29884	-0.69061	0.03624	0.64585	0.74755	0.03469	1.00000

3.7.2. Resultados de la fase de campo

a. Cadmio total, Cd disponible en el suelo y, Cd en granos de cacao

La fase de experimento en campo se realizó usando como cultivo indicador al cacao, previamente se verificó el antecedente de la parcela, el cual indicó que el grano de cacao estuvo con altas concentraciones de Cd por encima de los 0,5 ppm (valor máximo permisible por la Unión Europea). Los resultados del ANOVA para Cd total en el suelo indicaron que no hubo diferencia entre los tratamientos (p -valor=0,19). Mientras que hubo alta diferencia significativa entre los tratamientos para Cd disponible en el suelo, los tratamientos con Biochar al 1% y Control presentaron las mayores concentraciones, los demás tratamientos las más bajas concentraciones. Sin embargo, el Cd en granos de cacao fue más alto en los tratamientos Control, Biochar 2% y, Commelina, mientras que los tratamientos con HMA y Comelina+HMA presentaron los valores más bajos (**Tabla 16**).

Tabla 16: Cd total, Cd disponible y Cd en granos de cacao (mg kg^{-1}) y, valores F del efecto tratamiento en el experimento en campo. Las letras diferentes entre tratamientos corresponden a diferencias significativas a un nivel de $p < 0,05$.

Tratamiento	Cd total	Cd disponible	Cd en grano
Control	0,63a	0,26a	0,94a
Biochar 1%	0,60a	0,25a	0,74ab
Biochar 2%	0,64a	0,21b	0,88a
Commelina	0,57a	0,19b	0,65a
HMA*	0,58a	0,19b	0,56b
Commelina+HMA	0,59a	0,21b	0,71b

ANOVA						
Fuentes de Variación	Valor F	p-valor	Valor F	p-valor	Valor F	p-valor
Tratamiento	1,84	0,19	4,94	0,01	3,24	0,05
Repetición	0,10	0,90	1,00	0,40	0,24	0,79

*Hongos que causan micorriza arbuscular

b. Análisis de componentes principales (ACP)

Con los parámetros que se muestran en la **Tabla 17** se realizó el análisis de componentes principales (ACP), donde el criterio de clasificación fue los tratamientos de remediación de suelos contaminados. A partir de este análisis estadístico se obtuvo el gráfico de biplot (**Figura 12**). La variación de la información explicada por la componente 1 (CP1) y componente 2 (CP2) es del 76,2% y 22,5% respectivamente, acumulando el plano determinado por las dos primeras componentes (CP1 y CP2) el 98,7% de la información (**Figura 12**). Del análisis del mismo se observa que el componente principal 1 (CP1) separa en distintos cuadrantes los parámetros Cd total, Cd disponible y Cd en granos ponderados positivamente (**Tabla 17**). En este eje (CP1), el tratamiento con Biochar 1% y Control presentaron mayor relación positiva con el Cd en grano, Cd disponible y Cd total en el suelo (**Tabla 18, Figura 12**). La segunda componente (CP2) separa en distintos cuadrantes los parámetros, Cd total y Cd en granos se ponderaron de forma negativa, mientras que el Cd disponible lo fue de forma positiva (**Tabla 17**). En este eje (CP2), los tratamientos con Commelina, HMA y Commelina+HMA estuvieron relacionados de forma negativa con el Cd total, Cd en granos y Cd disponible en el suelo (**Figura 12**) y, el Control guardó relación positiva con el Cd total, Cd disponible y Cd en granos (**Figura 12**).

Tabla 17: Valores de correlación entre los componentes principales y las variables medidas en el suelo y grano (*)

Variables	Unidades	CP1	CP2
Cd total	mg kg ⁻¹	0,93	-0,36
Cd disponible	mg kg ⁻¹	0,69	0,72
Cd en grano	mg kg ⁻¹	0,97	-0,36

Tabla 18: Relación de las variables con los autovectores

Variables	e1	e2
Cd en grano	0,64	-0,21
Cd total	0,61	-0,43
Cd disponible	0,46	0,88

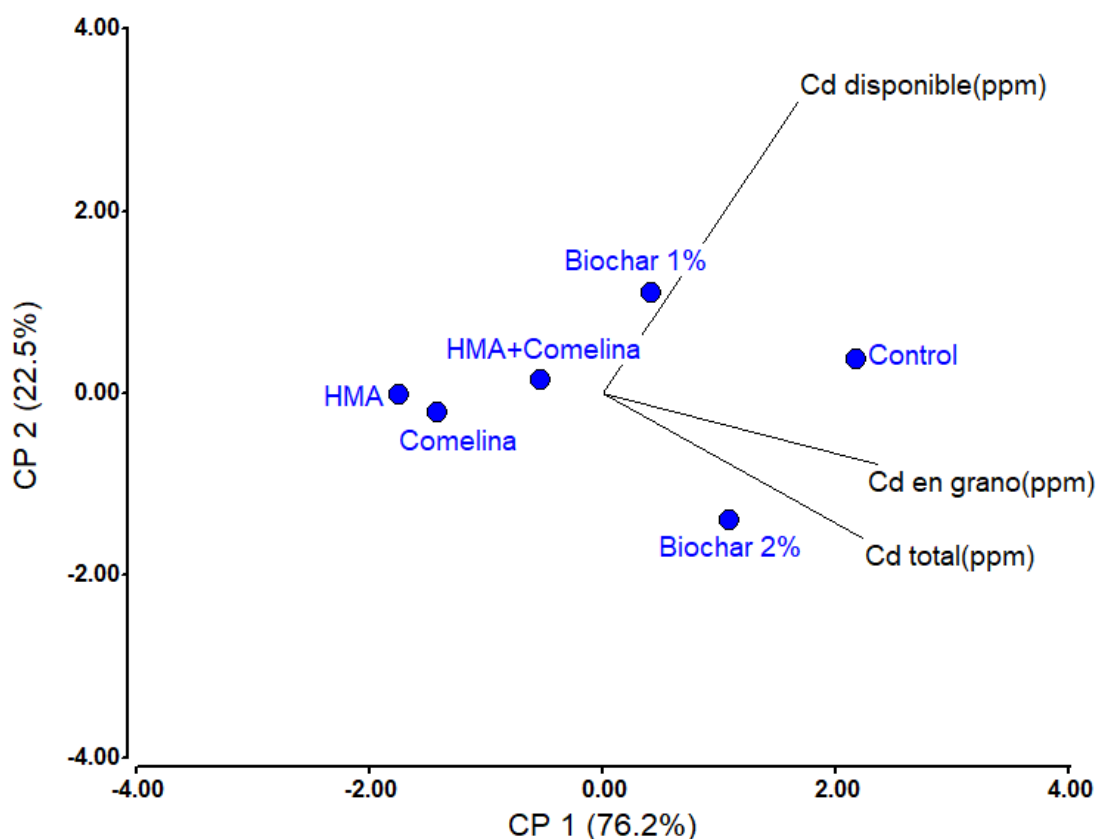


Figura 12: Análisis de componentes principales. Los vectores indican el peso relativo de cada variable sobre los ejes: El Cd total, Cd disponible y Cd en granos de cacao. Los círculos son los tratamientos: Control, Biochar 1%, Biochar 2%, Commelina, HMA y Commelina+HMA

c. Correlación entre el Cd total, Cd disponible y Cd en granos de cacao

Los resultados de la correlación de *Pearson* mostraron que las más fuertes relaciones fueron entre el Cd en granos de cacao y Cd disponible en el suelo ($r^2=0,53$), mientras que el Cd total y Cd disponible presentaron un $r^2=0,33$. El Cd total en el suelo y Cd en grano presentaron las más bajas relaciones ($r^2=0,24$) (**Tabla 19**).

Tabla 19: Coeficientes de correlación entre Cd total, Cd disponible y Cd en granos de cacao

Coeficientes de correlación

Correlación de Pearson: Coeficientes\probabilidades

	Cd en grano	Cd total	Cd disponible
Cd en grano	1.00	0.24	0.53
Cd total	0.29	1.00	0.33
Cd disponible	0.16	0.24	1.00

3.8. Discusión de resultados

3.8.1. Fase de invernadero

En la fase de invernadero usando al cultivo de pimiento como indicador y su interacción con los tratamientos en suelos contaminados con metales pesados, los resultados obtenidos se interpretan de la siguiente manera.

a. Concentración de clorofila en hojas medido con un medidor portátil SPAD

La concentración de clorofila medido con SPAD fue diferente entre los tratamientos (**Tabla 08**), los tratamientos con disolución nutritiva, disolución nutritiva+biochar, humato y humato+biochar presentaron mayores concentraciones de clorofila. Estos resultados sugieren que, pese a la contaminación del suelo con metales pesados, la planta que dispone de nutrientes en el suelo tiende a desarrollarse con normalidad, los metales pesados no estarían interfiriendo en la absorción de los nutrientes esenciales y su posterior síntesis de clorofila. Sin embargo, los tratamientos Control y sólo con biochar tuvieron un menor desarrollo de clorofila, debido a que con éstos tratamientos la disponibilidad de nutrientes para las plantas fue bajo. Para Beltrán-Pineda y Gómez-Rodríguez (2016) se conoce la acción tóxica de los metales pesados en la salud de las personas, pero se conoce poco de los mecanismos de toxicidad que estos ejercen sobre las plantas. Por otro lado, Navarro-Aviñó *et al.* (2007) indican que la principal causa de la toxicidad de los metales pesados es su unión con otras moléculas orgánicas del organismo, los efectos tóxicos de los mismos en el sistema biológico son dependientes de sus reacciones con los ligandos que son esenciales para su asimilación, estos ligandos existen en grandes cantidades dentro del organismo. La toxicidad y el comportamiento oxidativo de los metales pesados dentro de las células del organismo dependen de las reacciones químicas que éstos producen. Los resultados de este trabajo, sugieren que los metales pesados (Cd y Pb) no afectaron a la formación de la clorofila y a la nutrición vegetal, esto probablemente al corto tiempo de este experimento, con lo cual hubo baja interacción planta-suelo contaminado.

La concentración de clorofila medida con SPAD en las plantas de pimiento indica el nivel de concentración de nitrógeno en las plantas, a mayores valores de clorofila, hay más nitrógeno en la planta y viceversa. Está documentado que las unidades SPAD medidas con detector de clorofila SPAD guarda una estrecha relación con la concentración de nitrógeno total de las plantas, cuando éstos últimos se midieron con métodos tradicionales (Reeves *et al.*, 1993; Rodríguez *et al.*, 1998). Estas correlaciones se realizaron en cultivos de leguminosas, gramíneas, frutales y hortalizas. Según Rodríguez *et al.* (1998) “los valores SPAD se basan en el principio de que parte de la luz que llega a la hoja es absorbida por la clorofila y el resto que se refleja entra en contacto con la celda detectora del SPAD y es convertida en una señal eléctrica”. Por lo cual, en este trabajo se asume que el desarrollo de las plantas (síntesis de

nitrógeno) está relacionado con la concentración de clorofila. Sólo los tratamientos Control y Biochar tuvieron los más bajos valores de concentración de clorofila medido con sensor SPAD (**Figura 05**), lo cual es razonable porque ambos tratamientos no aportan nutrientes esenciales para las plantas, con lo cual no alcanzaron el mismo desarrollo que los tratamientos que disponían de nutrientes como el humato y disolución nutritiva y sus distintas combinaciones.

b. Peso fresco de hojas, tallos y frutos

Los tratamientos afectaron al peso de las hojas, peso de tallos, pero no tuvieron efecto sobre el peso de los frutos de pimiento (**Tabla 09**). Del mismo modo que para concentración de clorofila, los tratamientos con mayor peso de hojas y tallos fueron con humato y disolución nutritiva y, sus distintas combinaciones. Estos resultados son atribuibles al aporte de nutrientes de los tratamientos con estos tratamientos, mientras que sólo el Biochar y Control al no aportar nutrientes provocaron menos desarrollo de material vegetal expresado en peso fresco de hojas y tallos. Pese a estar en un suelo contaminado con metales pesados, las plantas que se encontraban en un medio con mayores contenidos de nutrientes en el suelo habrían tomado los nutrientes en forma normal. Algunos metales y metaloides no esenciales para las plantas pueden ser absorbidos, trasladados y acumulados en la planta porque su comportamiento electroquímico es parecido a los nutrientes que requieren las plantas (Miranda *et al.*, 2008), si los niveles de disponibilidad de metales pesados son bajos, no se visualizan síntomas de toxicidad en la planta. Si bien, está documentado que los síntomas de toxicidad del Cd son la clorosis por la deficiencia de Fe, fosfatos o el bajo transporte de Mn (Barrueta, 2015), los resultados en este experimento sugieren que el nivel de contaminación del suelo no fueron suficientes para producir efectos visibles en el peso del tallo y hojas de plantas de pimiento. El mayor peligro de la contaminación de suelos con metales pesados es la expresión de su toxicidad en la bioacumulación de los mismos en los organismos vivos (órganos cosechables de las plantas) sin que puedan metabolizar o excretar el Cd absorbido, esta bioacumulación puede persistir en el ambiente y acumularse en los organismos a lo largo del tiempo (HELVENTAS, 2018) y, consecuentemente producir daños en el consumidor final (seres humanos).

Por otro lado, no se vieron diferencias entre los tratamientos cuando se evaluó el peso de frutos, esto puede ser atribuible al corto periodo de desarrollo de frutos, ya que el experimento duró 3 meses, con lo cual no alcanzaron madurez fisiológica.

c. Concentración de Cd y Pb en el agua de poro

Las mayores concentraciones de Cd y Pb se vieron con el tratamiento Control, mientras que con disolución nutritiva y biochar y, sus combinaciones los niveles de concentración de Cd y Pb en el agua de poro fueron más bajos (**Tabla 10, Figura 07**). Estos resultados sugieren que el biochar es una enmienda que estaría inmovilizando a los metales pesados, para evitar que estén disponibles en el agua de poro. Se denominó agua de poro al agua capilar extraído con las sondas ryson, que sería el agua que está siendo absorbido por las plantas. Obaji *et al.* (2017) también vieron mejores resultados de retención de Pb y Cd usando biochar, lombriabono y piedra pómez, ellos lo atribuyen a la alta superficie específica del biochar al ser obtenido por pirolisis bajo condiciones de alta temperatura (500°C), con lo cual su capacidad de adsorción aumenta produciendo mayor adsorción de metales pesados. Además de inmovilizar a los metales pesados en el suelo, el biochar puede mejorar la calidad del suelo, incrementado los nutrientes, mejorando la capacidad de retención de agua (Venegas, 2015). Estos resultados sugieren que el biochar podría ser una alternativa a ser usado como inmovilizador de metales pesados en suelos contaminados, sumado al efecto positivo de la disolución nutritiva que aporta nutrientes esenciales para las plantas, el tratamiento se complementaría.

d. Concentración de Cd y Pb total en el suelo al final del ensayo

Los tratamientos con Biochar y Humato presentaron mayores concentraciones de Cd total en el suelo, mientras que los más bajos correspondieron a los tratamientos humato+biochar y Control (**Figura 08, Tabla 11**). Los valores obtenidos en este ensayo corresponden a la fracción total, lo cual es la suma del Cd disponible, más Cd intercambiable, más Cd en los minerales del suelo, y el de otras fracciones. Por lo cual, la fracción total no es una buena alternativa a ser tomado en cuenta en las decisiones, ya que no es la forma disponible para ser absorbido por la planta. La disponibilidad de los metales pesados del suelo depende de otros factores como su concentración el agua del suelo y la capacidad de liberación de los mismos metales desde la fase sólida del suelo (Barrueta, 2015). Las reacciones del Cd con cada componente del suelo depende también de la textura, pH del suelo, materia orgánica, arcillas y tipos de arcilla, CIC, carbonatos y óxidos de Fe y Mn (Rodríguez *et al.*, 2006). Así, en suelos con pH ácido los metales pesados se hacen más disponibles, a mayor materia orgánica los metales pesados se fijan en los suelos inmovilizándolos, a texturas más finas también los metales pesados suelen fijarse más, lo mismo ocurre cuando hay más CIC en los suelos (Estévez *et al.*, 2000). Los suelos usados para este experimento tenían un pH neutro (7,34), materia orgánica baja (1,69%) y textura franco-arcillo-arenosa (**Tabla 01**), con estas características la disponibilidad de los metales pesados es baja, aunque el Cd total en el suelo sea alto.

Por otro lado, el rango intercuartil de Cd total fue entre 14,3 y 20,4 mg kg⁻¹ (**Tabla 07**). Estos resultados se encuentran muy por encima de las concentraciones máximas aceptables por la Unión Europea que es de 3 mg kg⁻¹ (Miranda *et al.*, 2008). Con lo cual, es más probable que los cultivos respondan con frutos contaminados, resultando en un peligro para la salud de los consumidores.

e. Concentración de Cd y Pb en hojas de pimiento

El tratamiento Control tuvo la más altas concentración de Cd y Pb en hojas del pimiento, mientras que el tratamiento con Biochar+Humato las más bajas concentraciones (**Tabla 12, Figura 10**). Lo cual, es razonable porque el tratamiento donde no se agregó ningún tratamiento (i. e. Control) habría liberado más metales a la fracción disponible, con lo cual las plantas los acumularon más en las hojas. Al encontrar más metales pesados en la fracción disponible, existe una tendencia de las plantas de bioacumular en los órganos vegetativos. La bioacumulación es el aumento en la concentración de dichos metales en un organismo vivo en un determinado periodo de tiempo, comparada con la concentración habitual de los metales pesados en el ambiente (Prieto-Méndez *et al.*, 2008). A nivel molecular, las plantas pueden inactivar enzimas y proteínas, con lo cual pueden bloquear y sustituir los metales esenciales de los grupos funcionales en biomoléculas cuando hay presencia de metales pesados en la fracción disponible del suelo (Yadav, 2010), con lo cual aumentan su absorción y acumulación de Cd en las hojas. Lo cual habría ocurrido para el caso del tratamiento Control, al encontrar más Cd y Pb disponibles los bioacumuló en mayor medida en las hojas del cultivo sustituyendo a los nutrientes esenciales que habitualmente son absorbidos por las plantas. Prieto *et al.* (2009) indican que los metales pesados (Cd y Zn) son absorbidos en mayor grado por las hortalizas, luego en las hojas se llegan a acumular en mayores contenidos, lo cual provoca disminución del área foliar y provoca clorosis y acortamiento de raíces. Según Mejía (2011) otro mecanismo de ingreso de metales pesados a la planta, es por absorción foliar cuando los metales pesados provienen de fuentes aéreas, por penetración cuticular contra un gradiente de concentración. La absorción y acumulación de metales pesados en las hojas son atribuibles a su capacidad de retención por el suelo y a la interacción planta-raíz-metal y al metabolismo vegetal propio (Prieto *et al.*, 2009). Los resultados de este experimento sugieren que las hojas

son los órganos más sensibles, porque pueden acumular más metales pesados al encontrarlos disponibles en el suelo.

Por otro lado, las hojas de las plantas con el tratamiento Biochar+Humato presentaron las más bajas concentraciones de Cd y Pb (**Figura 10**). Estos resultados son razonables porque el Biochar tiene la capacidad de aumentar la inmovilización de metales pesados mediante reacciones de quelación, atrapándolos en su superficie, esto debido a que el biochar tiene una alta superficie específica (Sohi *et al.*, 2009). Con lo cual, la acumulación del Cd y Pb en las hojas fueron las más bajas, esto sumado al efecto del humato que también tiene capacidad de adsorber a los metales pesados, además de proveer nutrientes para las plantas. Con lo cual, se sugiere el uso del biochar como inmovilizador de metales pesados en el suelo.

f. Concentración de Cd y Pb en frutos de pimiento

La concentración de Cd y Pb en frutos del cultivo de pimiento fueron iguales estadísticamente (**Tablas 13 y 14**). Lo cual, es atribuible al muestreo temprano de la planta, ya que al término del ensayo, los frutos aun no alcanzaron la madurez fisiológica. Esto, debido al corto tiempo de estancia en el laboratorio de la Universidad Autónoma de Madrid, se cosechó los frutos al término de 3 meses, antes de la madurez fisiológica de los frutos. Vale señalar que este cultivo es una solanácea muy cultivada y de mucho consumo en España, el fruto se consume en forma fresca y seca debido a su alto contenido de vitamina C y A, ácidos fenólicos, flavonoides y su actividad antioxidante (Po *et al.*, 2018). El Cd en frutos varió entre 0,41 y 3,88 mg kg⁻¹, mientras que el Pb en frutos varió entre 0,02 y 0,19 mg kg⁻¹ (**Tabla 14**). Para el caso del Cd, estos valores sobrepasan a las concentraciones máximas permisibles por la unión europea que es de 0,5 mg kg⁻¹, pese al efecto inmovilizador del biochar y el humato, los niveles de concentración de metales pesados en los frutos son altos, debido a una alta contaminación del suelo y a otros factores propios de las características del suelo como su capacidad de liberar metales pesados a la fracción disponible.

g. Relación entre la concentración de clorofila y peso de hojas

La concentración de clorofila de las hojas estuvo estrechamente relacionada con el peso de las hojas (**Figura 11**). El 75% del peso de hojas estuvo explicado por la concentración de clorofila en hojas ($r^2=0,75$, **Figura 11**), lo cual es razonable, porque la concentración de clorofila indica el de desarrollo de la actividad fotosintética de la planta. A mayor desarrollo, las plantas generarían más materia seca en la parte foliar. Otros trabajos también mostraron que las unidades SPAD con clorofila, presentan la misma tendencia al ser relacionadas con el desarrollo de los cultivos (Wood *et al.*, 1992).

Los tratamientos Control y Biochar presentaron las más bajas concentraciones de clorofila y peso de hojas, mientras que los tratamientos con disolución nutritiva, humatos y sus combinaciones mostraron valores más altos de concentración de clorofila y peso de hojas (**Figura 11**). Lo cual se puede atribuir al bajo aporte de nutrientes con Biochar y el tratamiento Control, mientras que cuando se agregaron nutrientes a través de la disolución nutritiva y humatos, las plantas alcanzaron mayor desarrollo de biomasa y por consiguiente mayor concentración de clorofila. La clorofila es importante para realizar la fotosíntesis, con lo cual las plantas pueden sintetizar más fotosintatos y destinarlos a la formación de materia seca. Fenech-Larios *et al.* (2009) también han mostrado que la concentración de clorofila medida con SPAD guarda alta relación con la producción de materia seca de las plantas, además es un método no destructivo para medir el contenido de clorofila, ellos usaron al cultivo de albahaca como indicador. Si bien, Miranda *et al.* (2008) indicaron que el Cd puede interferir en la entrada, transporte y utilización de los nutrientes (Ca, Mg, P y K) y del agua, los resultados de este

experimento sugieren que la nutrición del cultivo de pimiento fue relativamente normal en un medio con suelo contaminado con metales pesados. Por lo cual, los tratamientos con disolución nutritiva y humatos y, sus combinaciones sintetizaron más clorofila y consecuentemente mayor peso de hojas.

h. Correlación entre la concentración de Cd y Pb del suelo, del agua de poro y de los órganos vegetativos de la planta

El Cd de los frutos de pimiento guardó relación positiva con el Cd en las hojas (**Tabla 15**, $r^2=0,45$). Lo cual es razonable porque los fotosintatos destinados al fruto provienen de las reservas que las plantas acumulan en las hojas. La capacidad para bioacumular metales pesados de las plantas depende de la especie vegetal, Tantalean y Huauya (2017) vieron mayor concentración de Cd en hojas, seguido de raíces y frutos y, su distribución desigual en toda la planta. Ellos también indican que se conocen ampliamente los efectos tóxicos del Cd en las plantas, pero las hojas de los cultivos pueden bioacumular metales pesados para luego transferirlos a los frutos.

El Cd de las hojas y el Cd del agua de poro con el Cd total del suelo al final del ensayo guardaron relación positiva (**Tabla 15**). Esto podría ser atribuido a que, el Cd total del suelo puede ser liberado y aumentar su concentración en la fracción disponible, con lo cual aumentaría su contenido en el agua de poro, el cual está inmediatamente disponible para las plantas, y en consecuencia aumentar también su concentración en las hojas de las plantas. Una vez que los metales pesados son absorbidos por las raíces, en primer momento se unen a la pared celular de las células epidérmicas para luego ser traslocados por intercambio iónico al resto de la planta (Pernía *et al.*, 2008), incluyendo las hojas. El suelo puede liberar Cd a la fracción disponible dependiendo de las características del suelo, en este caso, el suelo no tuvo las condiciones favorables para una alta liberación de metales pesados, ya que el pH no fue ácido, la materia orgánica fue baja, así como el CIC fue bajo, sin embargo los niveles de contaminación fueron muy altos, por lo cual habrían liberado Cd a la fracción disponible que luego fue usado por la planta.

Se vieron relaciones positivas entre el Pb en hojas con el Pb en el agua de poro ($r^2=0,56$). El Pb en hojas con el Pb en el suelo total del suelo se relacionaron también de forma positiva (**Tabla 15**, $r^2=0,31$). Estos resultados son atribuibles a las altas concentraciones de Pb en el suelo, el 50% de los datos estuvieron entre 7359,8 y 7811,2 mg kg⁻¹. Esto indica una fuerte contaminación del suelo con Pb, por lo que es razonable encontrarlas en el agua de poro (Pb disponible) y en las hojas. Barceló y Poschenrieder (1992) indican que es alta la incertidumbre sobre la especificidad de los mecanismos de absorción de los metales pesados, pero en condiciones de alta contaminación, la respuesta de las plantas es alta, ya que absorben también grandes cantidades de los metales pesados. El Pb en frutos con el Pb en hojas ($r^2=0,94$) también guardaron relación positiva (**Tabla 15**), esto es atribuible también a los elevados niveles de contaminación con Pb del suelo, además las reservas absorbidas de las plantas los acumulan primero en las hojas, luego los destinan a los frutos, si el fotoasimilado contiene Pb, es razonable que se encuentre Pb en los frutos. Rueda *et al.* (2011) también informaron que existe una gran variabilidad de contaminación de suelos con metales pesados, esto se debe al material parental del suelo y al manejo antropogénico, pero en condiciones de contaminación, se suelen ver fuerte contaminación de frutos.

Por otro lado, la concentración de Clorofila de las hojas medidas con SPAD tuvo relaciones negativas con el Cd y Pb en frutos, Cd y Pb en plantas, Cd y Pb en agua de poro (**Tabla 15**). Esto es atribuible al efecto negativo del Cd y Pb en el desarrollo de la clorofila de las hojas,

aunque no se hayan visto magnificados estos efectos. Los metales pesados pueden modificar la apertura estomática y la transpiración (Rodríguez *et al.*, 2008), pueden reemplazar al ion Mg en la molécula de la clorofila, lo que hace imposible la captación de fotones, consecuentemente disminuyendo la actividad fotosintética (Pernía *et al.*, 2008). Al haber altos contenidos de Cd y Pb en el agua de poro, es probable que hayan afectado a la formación de clorofila en las hojas.

3.8.2. Fase de campo

En la fase de campo usando al cultivo de cacao como indicador y su interacción con los tratamientos en suelos contaminados con metales pesados, los resultados obtenidos se interpretan de la siguiente manera.

a. Cadmio total, Cd disponible en el suelo y, Cd en granos de cacao

El Cd total en el suelo no fue afectado por los tratamientos (**Tabla 16**, p-valor=0,19). Vale aclarar que la fracción total de Cd en el suelo es la suma de Cd disponible, más Cd intercambiable, más Cd no disponible. Si bien, los tratamientos pudieron haber afectado al contenido de Cd en el suelo, el Cd total fue insensible al efecto de los tratamientos después de 6 meses de interacción planta-suelo contaminado-tratamientos. En otro estudio realizado por Huamaní-Yupanqui *et al.* (2012) vieron contenidos promedios de Cd en suelos de Tingo María de $0,53 \text{ mg kg}^{-1}$, lo cual está por debajo de lo establecido como límite máximo permisible por la Unión Europea en suelos agrícolas, que es de 3 mg kg^{-1} (Acevedo, 2005). En este estudio el 50% de los datos de Cd total estuvieron entre $0,57$ y $0,62 \text{ mg kg}^{-1}$ también menores al límite permisible establecido por la Unión Europea. Sin embargo, en nuestro país, el MINAM ha establecido estándares de calidad (ECA) y como límite máximo permisible de Cd en suelos es de $1,46 \text{ mg kg}^{-1}$ (OEFA, 2017), éstos resultados se encontrarían por debajo del límite establecido por el MINAM. La presencia de metales en el suelo puede tener origen genético o antropogénico, en los suelos usados para este estudio se desconoce la fuente. La fracción disponible en el suelo se renueva de la fracción total, la capacidad de hacer disponible a los metales pesados en el suelo, depende de las características propias del suelo. En este caso, el pH del suelo fue de 7,15, baja materia orgánica y bajo CIC (resultados no mostrados), siendo estas características que disminuyen la capacidad de disponibilidad de los metales pesados. Sin embargo, aunque lento, pero se puede hacer disponible el Cd en el suelo. Estévez *et al.* (2000) vieron mayor retención de Cd en el suelo en condiciones de alta materia orgánica, suelos arcillosos con alta CIC y bajo Aluminio. Además, los resultados en este estudio sugieren que el Cd total en el suelo es poco sensible a las alternativas de inmovilización y biorremediación en suelos contaminados.

Los tratamientos afectaron a la concentración de Cd disponible en el suelo, sólo los tratamientos Control y Biochar al 1% presentaron las más altas concentraciones de Cd disponible y, los demás tratamientos todos tuvieron menos Cd disponible (**Tabla 16**). Vale señalar, que el Cd disponible obtenido con solución de EDTA 0,05M representa al Cd inmediatamente lista para ser absorbida por las plantas. Esta fracción disponible sería la más sensible a los tratamientos, porque se vio efecto de los tratamientos. Los tratamientos Control y con Biochar al 1% habrían liberado más Cd a la fracción disponible, con lo cual se podría sugerir que la concentración al 1% de Biochar no es lo adecuado para inmovilizar al Cd en el suelo, sino más bien Biochar al 2%, con lo cual se vieron más bajos contenidos de Cd disponible. El biochar al tener alta área superficial y contenido de carbono aromático de alta estabilidad puede inmovilizar el Cd en el suelo (Jindo *et al.*, 2014), esto sumado a la concentración de biochar adecuada (i. e. 2%) podría ser una buena alternativa para reducir la absorción de Cd por las plantas.

Además del Biochar al 2%, los tratamientos con HMA y Commelina+HMA también presentaron valores más bajos de Cd disponible (**Tabla 16**), lo que se busca para evitar su absorción por el cultivo. Esto es atribuible al efecto positivo de los hongos que causan micorrizas arbusculares (HMA). Existen muchos intentos por explicar la asociación hongo-planta y su papel en suelos contaminados con metales pesados, lo cual aún es un tema poco conocido (Janousková *et al.*, 2005). Sin embargo, existen muchos estudios que informan el efecto benéfico de la asociación de micorrizas con las raíces de plantas en la mejora de la nutrición y su tolerancia a los estreses producidos por metales pesados (Rivera-Becerril *et al.* 2002, 2005; Malcová *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003). Taylor y Percivar (2001) también vieron que el Cd disponible se redujo entre 55% y 90% en suelos contaminados con el efecto de HMA. Janouskova *et al.* (2006) también vieron menos Cd disponible en suelos inoculados con micorrizas. Los resultados en este estudio también confirman el efecto benéfico de los hongos que causan micorrizas arbusculares (HMA) reduciendo la disponibilidad de Cd en suelos contaminados. Las micorrizas se encuentran naturalizadas en un 90% de las especies vegetales en la tierra, además de una simbiosis con la raíz, sus hifas proporcionan de agua y nutrientes esenciales (nitrógeno y fósforo principalmente) a las plantas, sumado a la protección contra algunas enfermedades, mitigan efectos de estrés abiótico (Bolan, 1991; Borde *et al.*, 2011; Lou *et al.*, 2017). La planta, por su parte se encarga de proveerles azúcares producto de la fotosíntesis y ácidos grasos (Jung *et al.*, 2012; Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988). Estos efectos positivos mejoran la longevidad y biomasa del vegetal con lo cual enfrenta estreses ambientales, además las micorrizas mejoran la estabilidad y agregado de partículas en el suelo (Khan, 2006). Los resultados de este estudio también confirman los efectos benéficos de la micorriza (HMA) en la interacción planta-suelo contaminado con Cd. El rango intercuartil de Cd disponible en el suelo fue entre 0,19 y 0,23 mg kg⁻¹, por debajo de los límites máximos establecidos para la Unión Europea y para nuestro país.

Por otro lado, los tratamientos también afectaron al Cd en granos de cacao, los valores más bajos correspondieron a los tratamientos con HMA y Commelina+HMA, por el otro extremo los tratamientos Control y Biochar al 2% y Commelina estuvieron más contaminados con Cd los granos (**Tabla 16**). Estos resultados confirman el efecto benéfico de los hongos que causan micorrizas arbusculares (HMA). Si bien, las concentraciones de Cd en el suelo fueron bajas, el rango de concentración de Cd en granos fue entre 0,57 mg kg⁻¹ y 1,03 mg kg⁻¹, superiores al límite máximo permisible por la Unión Europea que es de 0,5 mg kg⁻¹ (The European Parliament and the Council of the European Union, OJEU, 2014). Lo cual, sugiere el comportamiento bioacumulador del cultivo de cacao y, esta acumulación sería principalmente en el órgano cosechable que es el fruto. Mite (2010) reportó también el comportamiento acumulador del cultivo de cacao en todos los órganos vegetativos de la planta, que finalmente los destina al grano.

Los hongos que causan micorrizas en el suelo (HMA) redujeron en un 30% la concentración de Cd en granos de cacao (de 0,94 mg kg⁻¹ del tratamiento Control a 0,65 mg kg⁻¹ del tratamiento HMA, **Tabla 16**). Si bien, se vio el efecto positivo del HMA, las concentraciones de Cd en granos todavía fueron superiores a 0,5 mg kg⁻¹, que es el límite máximo permisible por la Unión Europea (OJEU, 2014). Esto puede atribuirse al corto tiempo de interacción entre el HMA-plantas de cacao-suelo contaminado, ya que se dejó 6 meses para que esta interacción ocurra, probablemente si se deja más tiempo, estos efectos positivos serían magnificados. Jácome (2017) vio mayores efectos del HMA a partir de la semana 17, ellos sugieren que a mayor tiempo de interacción se ven menores concentraciones de Cd en la parte vegetativa, pero aumenta en las raíces del cultivo. Otros autores también han reportado que la simbiosis HMA-planta puede reducir la traslocación de metales pesados en distintas especies vegetales

(Janousková *et al.*, 2006; Merlos *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016). Los hongos que causan micorrizas producen una glucoproteína llamada glomalina que intervienen en el momento de establecer enlaces con moléculas de alta toxicidad, que funcionan como una barrera eficaz para acumular metales pesados (Lopes-Leal *et al.*, 2016; Shahabivand *et al.*, 2012). Los resultados de este ensayo también sugieren que el uso de HMA puede ser una buena alternativa biotecnológica en el manejo de agrosistemas cacaoteros en suelos contaminados con metales pesados.

La commelina unida al HMA también demostró ser una buena alternativa para reducir el Cd en granos de cacao (**Tabla 16**). La commelina (*Commelina erecta* L.) pertenece a la clase Liliópsida y familia Commelinaceae, es nativa de África, USA y Asia occidental (De Egea *et al.*, 2012) capaz de bioacumular metales pesados como el Cd desde el suelo. Por lo cual, algunos lo han usado como herramienta biológica para sacar a los metales pesados del sistema suelo de los agrosistemas. Esta especie vegetal crece como maleza, por lo que pasa desapercibido. Una práctica común es sembrarlos en suelos contaminados, cuando empieza la floración se eliminan desde la raíz, con lo cual se extraen grandes cantidades de metales pesados del suelo. Hernández-Colorado *et al.* (2012) vieron que la *Commelina erecta* acumuló en promedio 141 mg kg⁻¹ de Cu, aunque no superó a 1000 mg kg⁻¹, criterio que se considera para clasificar a una planta como hiperacumuladora de Cu (Baker y Brooks, 1989). Esta especie ha sido estudiada por muchos investigadores, por lo que es una referencia para realizar fitoextracción en la limpieza de suelos contaminados con Cd y Pb (Van der Lelie *et al.*, 2001) e incluso para remediar aguas superficiales y subterráneas (Dushenkov *et al.*, 1995). Los resultados de este ensayo sugieren que esta especie más el HMA pueden dar mejores resultados para evitar la acumulación de Cd en granos de cacao, ya que solo el tratamiento con Commelina no fue mejor que Commelina+HMA.

b. Análisis de componentes principales (ACP)

Las dos primeras componentes (CP1 y CP2) explicaron el 87,6% de la información que se muestra en el ACP (**Figura 12**). Esto indica una alta potencia de los resultados que muestra el análisis de componentes principales. En el CP1 el tratamiento con Biochar 1% y Control presentaron mayor relación positiva con el Cd en grano, Cd disponible y Cd total en el suelo (**Figura 12**). Es decir, los tratamientos que tuvieron más Cd en grano, Cd disponible fueron el Control y Biochar al 1%. Esto sugiere que la concentración de biochar al 1% no es lo adecuado, sino al 2%, con lo cual se vieron menos Cd disponible en el suelo. El alto área superficial del biochar pudo haber adsorbido e inmovilizado al Cd disponible en el suelo (Jindo *et al.*, 2014). Al encontrar más Cd disponible las plantas con el tratamiento Control y Biochar al 1% habrían absorbido y bioacumulado más Cd en los granos del cultivo de cacao, concordando con los reportes de Mite *et al.* (2010).

En el CP2, los tratamientos con Commelina, HMA y Commelina+HMA estuvieron relacionados de forma negativa con el Cd total, Cd en granos y Cd disponible en el suelo y, el Control guardó relación positiva con el Cd total, Cd disponible y Cd en granos (**Figura 12**). Es decir, los tratamientos con Commelina, HMA y Commelina+HMA tuvieron menos Cd total, Cd en granos y Cd disponible en el suelo. Estos resultados corroboran el efecto positivo del HMA para reducir el efecto tóxico del Cd en el suelo y en la planta concordando con otros autores (Li *et al.*, 2016, Merlos *et al.*, 2016). La glucoproteína producida por los hongos micorrízicos funcionan como una buena barrera para acumular metales pesados (Lopes-Leal *et al.*, 2016; Shahabivand *et al.*, 2012), aunque se desconocen los mecanismos de esta interacción hongo HMA-Cd, existen muchos reportes que corroboran el efecto benéfico del HMA en agrosistemas con suelos contaminados con metales pesados. La commelina, debido a su carácter acumulador, es usado

también como una buena alternativa para eliminar Cd del suelo de una manera natural (Hernández-Colorado *et al.*, 2012). Por otro lado, la tendencia del tratamiento Control fue contener mayor Cd total, Cd disponible y Cd en granos.

c. Correlación entre el Cd total, Cd disponible y Cd en granos de cacao

El Cd total y Cd disponible en el suelo presentaron relación positiva (**Tabla 19**). Lo cual es razonable, porque la fracción disponible se renueva del Cd total. Vale señalar que el Cd disponible contiene al Cd disponible en la solución del suelo, más Cd intercambiable, más Cd no disponible. Los niveles de disponibilidad de Cd a partir de la fracción total en el suelo, dependen de algunos factores propios en el suelo. Así, Huamaní-Yupanqui *et al.* (2012) vieron que en suelos arenosos, el Cd se hace menos disponible, debido a que la arena no tiene muchos sitios de intercambio para albergar al Cd^{+2} , mientras que los suelos arcillosos pueden contener más Cd^{+2} adsorbido y alimentar a Cd disponible. La clase textural del suelo en este estudio fue franco arcillo arenoso, con lo cual, el nivel de disponibilidad de Cd a partir de la fracción total es promedio. Estévez *et al.* (2000) indican que en suelos pobres en materia orgánica, baja CIC y menos Aluminio (pH básico), los suelos tienen mayor capacidad para hacer disponible al Cd total. Los suelos en este ensayo, presentaron baja materia orgánica, pH básico y CIC intermedio, con lo cual el nivel de disponibilidad de Cd es promedio.

El Cd disponible estuvo relacionado de forma positiva con el Cd en granos de cacao (**Tabla 19**). Esto es atribuible a la disponibilidad del Cd, con lo cual el cultivo absorbió y acumuló Cd en los granos. El tejido foliar del cultivo de cacao puede acumular distintas concentraciones de Cd, siendo las hojas las que principalmente acumulan Cd, luego el destino final de los fotoasimilados son los granos. Kabata-Pendais (2000) indicaron que hojas maduras presentan mayor capacidad para acumular Cd, por su lado Izquierdo (1988) sugirió que la bioacumulación del Cd en los órganos vegetativos es muy variable con el material genético de la planta, con las características climáticas de la región. En fin, es razonable que el Cd de los granos haya proveniendo del Cd disponible en el suelo mediante el fenómeno de la bioacumulación del cultivo de cacao.

El Cd total del suelo y el Cd en granos de cacao tuvieron baja relación ($r^2=0,24$, **Tabla 19**). Lo cual, es razonable, ya que el Cd total del suelo no explica la cantidad de Cd que ingresa al grano de cacao. Para que el Cd total se haga disponible y sea absorbido y bioacumulado por la planta, pasa por varios procesos químicos y físicos en el sistema suelo-planta, en este proceso se pueden reducir. Con lo cual, no se puede usar al Cd total del suelo como indicador de la contaminación con Cd en los granos de cacao.

3.9. Aporte de la investigación

En este trabajo se utilizaron dos ensayos, el primero en invernadero usando maceteros de 5 kg de capacidad y como planta indicadora al pimiento en un medio de suelo contaminado con metales pesados. Un segundo ensayo fue en campo, en Huamancoto, Tingo María usando como planta indicadora al cultivo de cacao en un agrosistema de suelos contaminados con metales pesados.

En el primer experimento en invernadero, se abordó el estudio del efecto del biochar al 5% de concentración, humato, disolución nutritiva y, sus distintas combinaciones. Los resultados nos permitieron observar que el biochar podría ser una alternativa para inmovilizar al Cd y Pb en el suelo, bajando su concentración en el agua de poro (fracción disponible para la planta). La nutrición vegetal del pimiento parece no ser afectado por la contaminación del suelo, ya que los tratamientos donde se agregó humato y disolución nutritiva generaron mayor materia seca y mayor concentración de clorofila a pesar de estar en un suelo contaminado, sin embargo

absorben el Cd que se encuentra disponible en el agua de poro acumulándolos más en las hojas y, finalmente en los frutos. Sería interesante complementar el estudio de este experimento con la interacción de hongos que causan micorrización (HMA), ya que estos microorganismos además de aportar agua y nutrientes para las plantas, pueden atrapar metales pesados y evitar su absorción por las plantas.

En el segundo experimento en campo, se estudió el efecto del biochar al 1% y 2% de concentración, hongos que causan micorrizas arbusculares (HMA) y *Commelina* como fitoextractora y, algunas combinaciones de éstos. Los resultados obtenidos de este experimento nos permitieron conocer que la concentración al 2% de biochar es lo adecuado, porque tiende a inmovilizar más al Cd en el suelo. Por otro lado, se vio un contundente efecto de los hongos micorrícicos (HMA) y su combinación con la *Commelina* porque disminuyeron la concentración de Cd en granos de cacao en solo 6 meses de experimento. Sin embargo, sería interesante conocer este efecto en el largo plazo, además también sería interesante estudiar los mecanismos que utilizan los hongos micorrícicos (HMA) para reducir el Cd disponible en el suelo y el Cd en los granos de cacao.

En forma general, para sintetizar los resultados obtenidos en el trabajo, se puede decir que las distintas alternativas para manejo de cultivos en agrosistemas contaminados con metales pesados, son buenos, unos más que otros, pero todos tienden a disminuir la acumulación de metales pesados en los frutos. Sin embargo, una buena alternativa biotecnológica para reducir el efecto de metales pesados en la concentración de los mismos en el fruto, es el uso de hongos que causan micorrizas (HMA). Explorar más a profundidad este tema podría ser la línea de investigación a seguir para lograr solucionar los problemas que ocurren en suelos contaminados con metales pesados.

Consideraciones finales

La combinación de biochar más humato ha resultado mejor alternativa para reducir la concentración de Cd y Pb en hojas de pimiento, debido al efecto inmovilizador de estas enmiendas y al aporte de nutrientes con el humato. Una planta bien nutrida no emite ácidos orgánicos que solubilizan y hacen disponible a los metales pesados en el suelo. Los efectos de estos tratamientos se hacen visibles al alcanzar la madurez fisiológica de los frutos aceptando nuestra hipótesis.

El Biochar al 5% de concentración aplicado en suelos contaminados con metales pesados ha reducido la concentración de Cd y Pb en el agua de poro (fracción disponible para la planta), aunque estos efectos no se vieron en el Cd total en el suelo.

La concentración más adecuada para la aplicación del biochar a suelos contaminados fue al 2% (20 g de biochar por kg de suelo), con lo cual se redujo mejor el Cd en la fracción disponible en el suelo. Sin embargo, los tratamientos con HMA y HMA+Commelina fueron superiores en la reducción de Cd disponible. Como era de esperarse, el Cd total, fue insensible al agregado de los tratamientos.

El Cd en los granos de cacao disminuyó más cuando se aplicaron los tratamientos HMA y HMA+Commelina, sugiriendo una buena alternativa biotecnológica, el uso de hongos que causan micorrizas arbusculares (HMA) en agrosistemas cacaoteros contaminados con metales pesados (i. e. Cd y Pb).

Se plantean como grandes desafíos hacia el futuro el uso de microorganismos que causan micorrización, extraídos de las raíces de los propios cultivos. Inoculados después de su multiplicación para regenerar la microbiota de suelos degradados y contaminados por metales pesados, e incluso por agroquímicos, la urbanización y la minería. Es aquí donde la remediación biológica realizará un papel central para evitar que cada vez más suelos se desvíen del destino que plantea una buena funcionalidad del agrosistema.

Bibliografía

- Acevedo, E.; Carrasco, M.; León, O.; Martínez, E. y Silva, P. (2005). Criterios de calidad de suelo agrícola, Ministerio de agricultura. Gobierno de Chile. 205 p.
- AENOR. (1997). *Noma Española UNE 77303*. Calidad del suelo - Pretratamiento de muestras para análisis físico-químico. Madrid: AENOR.
- AENOR. (2003). *Noma Española UNE 77322*. Calidad del suelo - Extracción de elementos traza solubles en agua regia. Madrid, España: AENOR
- Alloway, B. J. (2013). *Heavy metals in soils, trace metals and metalloids in soils and their bioavailability* (3ra ed.). Reading, UK: Springer.
- Arevalo, E.; Obando, M. E.; Zuñiga, L. B.; Arevalo C. O.; Baligar, V. y He, Z. (2016). Metales pesados en suelos de plantaciones de cacao (*Theobroma cacao* L.) en tres regiones del Perú. *Eología Aplicada* 15(2): 81-89.
- Augstburger, F.; Berger, J.; Censkowsky, U.; Heid, P. y Milz, J. (2000). Agricultura orgánica en el trópico y subtropical. En: Guía de 18 cultivos. 1ª edición. Alemania. 24 p. Disponible en: <http://www.naturaland.de/fileadmin/MDB/documents/Publication/Español/cacao.pdf>. Fecha de consulta: 15 de junio de 2018.
- Baker, A.J.M., Brooks, R.R. (1989). Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*. 1989(1): 81-126.
- Bandyopadhyay, S., S.K. Bhattacharya y P. Majumdar. (1994). Engineering aspects of bioremediation. pp. 55-75. In: Wise, D.L. y D.J. Trantolo (eds.). *Remediation of hazardous waste contaminated soil*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Barceló, J. y Poschenrieder, Ch. (1992). Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados. *Suelo y Planta*, 2:345-361.
- Barrueta, S. (2015). Guía de métodos de detección y análisis de Cadmio en cacao (*Theobroma Cacao* L). Lima (Perú): DEVIDA.
- Basta N. y McGowen, S. (2004). Evaluation of chemical immobilization treatments for reducing heavy metal transport in a smelter-contaminated soil. *Environmental Pollution* 127, 73 – 82. [En línea]. www.elsevier.com/locate/envpol [2007, Junio, 7].
- Becerril, J. M.; Muñoz-Rueda, A.; Aparicio-Tejo, P. & Gonzalez-Murua, C. (1988). The effect of cadmium and lead on photosynthetic electron transport in clover and lucerne. *Plant Physiol. Biochem.* 26: 357-363.
- Beltrán-Pineda, M. E. y Gómez-Rodríguez, A. M. (2016). Biorremediación de metales pesados cadmio (Cd), cromo (Cr) y Mercurio (Hg) mecanismos bioquímicos e ingeniería genética: una revisión. *Facultad de Ciencias Básicas* 12(2):172-197.
- Blum, A. (1988). *Plant Breeding for Stress Environments* 133-162. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Bolan, N. S. (1991). A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant and Soil*, 134(2), 189–207. <https://doi.org/10.1007/BF00012037>.
- Bolan, N.; Kunhikrishnan, A.; Thangarajan, R.; Kumpiene, J.; Park, J.; Makino, T.; Kirkham, M. & Scheckel, K. (2014). Remediation of heavy metal (loid)s contaminated soils-to mobilize or to immobilize. *Journal of Hazardous Material*, 266: 141-166.
- Borde, M.; Dudhane M. y Jite, P. (2011). Growth photosynthetic activity and antioxidant responses of mycorrhizal and non-mycorrhizal bajra (*Pennisetum glauca*) crop under salinity stress condition. *Crop Prot* 30:265–271.

- Bosecker, K. (2001). Microbial leaching in environmental clean-up programs. *Hydrometallurgy*, 59(2-3), 245-248.
- Cañizares R. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Rev Lat Microb*, 42:131-143.
- Cao, R.; Ma, L.; Chen, M.; Singh, S. y Harris, W. (2002). Impacts of Phosphate Amendments on Lead Biogeochemistry at a Contaminated Site. *Environmental Science and Technology*. Vol. 36. No. 24. [En línea] <http://lqma.ifas.ufl.edu/PUBLICATION-subject.html>. [2018, Junio 06].
- Cárdenas, A. (2012). Presencia de cadmio en algunas parcelas de cacao orgánico de la cooperativa Agraria Industrial Naranjillo, Tingo María, Perú. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Huánuco, Perú. 96 p.
- Chen, B.D., Li, X.L., Tao, H.Q., Christie, P. & Wong, M.H. (2003). The role of arbuscular mycorrhizal in zinc uptake by red clover growing in a calcareous soil spiked with various quantities of zinc. *Chemosphere*, 50, 839–846.
- Clark, R. B., (1982). *Plant response to mineral element toxicity and deficiency*. In: *Breeding Plants for Less Favorable Environments*. N. N. Christiansen & C. F. Lewis, (Eds.). 71-142. Wiley Interscience, New York.
- Clemente, R., Escobar, A., & Pilar, B., M. (2006). Heavy metals fractionation and organic matter mineralisation in contaminated calcareous soil amended with organic material. *Bioresource Technology*, 97(15), 1894-1901.
- Condezo, S. y Huaraca, C. V. (2018). Cuantificación de plomo, cadmio y arsénico en granos de cacao (*Theobroma cacao* L.) y café (*Coffea arabica* L.) de la zona de Jaen, Cajamarca durante el periodo de febrero-julio.2018. Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Norbert Wiener. Disponible en: http://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/UCV/32367/Panez_DL.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- Cui, L.; Li, L.; Zhang, A.; Pan, G.; Bao, D. y Chang, A. (2011). Biochar in soil vs Cd in rice. *Bioresource* 6 (3): 2605-2618.
- Cunningham, S.D. y C.R. Lee. (1995). Phytoremediation: Plant-based remediation of contaminated soils and sediments. pp. 145-156. In: *Bioremediation: Science and applications*. Special Publication 43. Soil Science Society of America. Madison, WI.
- De Egea, J.; Peña-Chocarro, M.; Espada, C. y Knapp, S. (2012). Lista de verificación de las plantas vasculares del Departamento de Neembucú, Paraguay. *PhytoKeys* 1(9):15-179.
- Dermont, G., Bergeron, G., Mercier, G., y Richer-Lafleche, M. (2008). Soil washing for metal removal: A review of physical/chemical technologies and field applications. *Journal of Hazardous Materials*, 152(1), 1-31.
- Dhal B, Thatoi H, Das N, Pandey B. (2013). Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium form contaminated soil and mining/ metallurgical solid waste: A review. *Journal of hazardous materials*, 250-251:272-291.
- Dushenkov, V.; Nanda, P.B.A.; Motto, H. & Raskin, I. (1995). Rhizofiltration: The use of plants to remove heavy metals form aqueous streams. *Environ. Sci. Technol.* 29:1239-1245.
- Estévez, J.; Andrade, M.L.; Marcet, P. y Montero, M.J. (2000). Fijación y movilidad de Cadmio y Zinc en tres tipos de suelos ácidos de Galicia, España. *Ciencia del suelo* 18(1):28-35.
- Fenech-Larios, L.; Troyo-Diéguez, E.; Trasviña-Castro, M.; Ruiz-Espinoza, F.; Beltrán Morales, A.; Murillo-Amador, B.; García-Hernández, J. y Zamora-Salgado, S. (2009). Relationship between a non-destructive method and a destructive extraction method, for measuring the chlorophyll content in basil seedling leaves (*Ocimum basilicum* L.). *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo* 25(1):99-102.

- Foy, C. D.; Chaney, R. L. & White, M. C. (1978). The physiology of metal toxicity in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 29: 511-566.
- Gadd, G. M. (2010). Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, 156(Pt 3), 609-643.
- Garbisu C, Alkorta I. (2003). Basic concept son heavy metal soil bioremediation. *European Journal of mineral processing and environ- mental protection*, 3: 58-66.
- HELVENTAS Swiss Inpercooperation. (2018). Cadena de valor del cacao: evidencias y desafíos normativos frente a la cuestión del cadmio. Ed. HALVENTAS Swiss Intercooperation. Nova Print SAC. Consultado 9/2/2020. Disponible en www.cooperacionsuizaenperu.org.pe/seco.
- Hernández-Colorado, R.R.; Alvarado, A. L. y Romero, R. M. (2012). Acumulación de cobre en plantas silvestres de zonas agrícolas contaminadas con metal. *Ciencia y Tecnología* 28(1 y 2): 55-61.
- Humani-Yupanqui H.A., Huauya-Rojas M.A., Mansilla- Minaya L.G., Florida-Rofner N. y Neira-Trujillo G.M. (2012). Presencia de Metales pesados en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao L.*) organico. *Acta Agronomica*, 61(4):339-344.
- Izquierdo, A. (1988). Determinación de contaminación con cadmio en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao L.*) y su posible origen en la región de Barvolento Estado Miranda. Tesis Maestría. Universidad Central de Venezuela. Venezuela.
- Jácome, D. A. (2017). Efecto de la inoculación de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) sobre un sistema suelo-planta de cacao en suelos contaminados con cadmio en estapa de vivero. Universidad Nacional de Colombia. Tesis para obtener el título de Magister en Ciencias Agrarias. Disponible en: <http://bdigital.unal.edu.co/62271/1/52817213.2017.pdf>.
- Janousková, M., Pavlíková, D., Macek, T. y Vosátka, M. (2005). Arbuscular mycorrhiza decreases cadmium phytoextraction by transgenic tobacco with inserted metallothionein. *Plant soil* 272:29-40.
- Janousková, M.; Pavlíková, D. & Vosátka, M. (2006). Potential contribution of arbuscular mycorrhiza to cadmium immobilisation in soil. *Chemosphere* 65: 1959-1965. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.07.007.
- Jindo, K., Mizumoto, H., Sawada, Y., Sanchez, M. A., Sonoki, T. (2014). Physical and chemical characterization of biochars derived from different agricultural residues. *Biogeosciences*, 1: 6613–6621.
- Jung, S. C.; Martinez-Medina, A.; Lopez-Raez, J. A. y Pozo, M. J. (2012). Review: Mycorrhiza induce resistance and priming of plant defenses. *J Chem Ecol.* 38(6):651-64.
- Kabata-Pendais A. (2000). Trace elements in soils and plants. 3th edition. CRC Press, Boca Raton, EE. UU. 413 p.
- Kavaruma V. y Esposito E. (2010). Biotechnological strategies applied to the descontamination of soils polluted with heavy metals. *Biotechnology advances*, 28:61-69.
- Khade S. y Adholeya A. (2007). Feasible biore- mediation through arbusculares. mycorrhizal fungi imparting heavy metal tolerance: a retrospective. *Bioremediation Journal*, 11:33-43.
- Khan, A.G. (2006). Mycorrhizoremediation an enhanced form of phytoremediation. *J of Zhejiang. Univ Science B.* 7(7): 503-514.
- Lehmann J., Silva, D. A.; Rondon M.; Silva, S.A.; Greenwood, C. M.; Nehls, J.; Steiner, T. y Glaser, B. (2002). "Slash- and- char: a feasible alternative for soil fertility management in the central Amazon?" 17th WCSS, 14-21 Agosto 2002, Tailandia. Symposium n°13, p449.
- Li, H.; Luo, N.; Zhang, J.; Zhao, H. M. ; Li, Y. W.; Cai, Q. Y.; Wong, M. H. y Mo, C. H. (2016). Do arbuscular mycorrhizal fungi affect cadmium uptake kinetics, subcellular distribution and

- chemical forms in rice?. *Sci. Total Environ.* 571: 1183-1190. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.07.124.
- Lopes-Leal, P.; Varón-López, M.; Gonçalves de Oliveira Prado, I. y Valentim dos Santos, J.; Fonsêca Sousa Soares, C. R.; Siqueira, J. O. & de Souza Moreira, F. M. (2016). Enrichment of arbuscular mycorrhizal fungi in a contaminated soil after rehabilitation. *Braz. J. Microbiol.* 47: 853-862. doi:10.1016/j.bjm.2016.06.001.
- Lovley, D. R. y Coates, J. D. (1997). Bioremediation of metal contamination. *Current Opinion in Biotechnology*, 8(3), 285-289.
- Lu, A., Zhang, S., y Shan, X. (2005). Time effect on the fractionation of heavy metals in soils. *Geoderma*, 125(3-4), 225-234.
- Luo, N., Li, X., Chen, A. Y., Zhang, L. J., Zhao, H. M., Xiang, L. y Li, H. (2017). Does arbuscular mycorrhizal fungus affect cadmium uptake and chemical forms in rice at different growth stages? *The Science of the Total Environment*, 599-600, 1564–1572. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.047>.
- Malcová, R., Vosátka, M., & Gryndler, M. (2003). Effects of inoculation with *Glomus intraradices* on lead uptake by *Zea mays L.* and *Agrostis capillaris L.* *Applied Soil Ecology*, 23(1), 55–67. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(02\)00160-9](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(02)00160-9).
- Marrero, J.; Díaz, A. y Coto, O. (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la Biorremediación. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 41 (1): 67-78.
- Marschner, H. (1990). Nutrient dynamics in the rhizosphere. In: *Nutrición Mineral Bajo Condiciones de Estrés*. 1-13, Servei de Publico i Intercanvi Científic de la UIB, Palma de Mallorca.
- Merlos, M. A.; Zitka, O.; Vojtech, A.; Azcón-Aguilar, C. & Ferrol, N. (2016). The arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* differentially regulates the copper response of two maize cultivars differing in copper tolerance. *Plant Sci.* 253: 68-76. doi: 10.1016/j.plantsci.2016.09.010.
- Miranda, D., C. Carranza, C. Rojas, C. Jérez, G. Fischer, y Zurita, J. (2008). Acumulación de metales pesados en suelo y plantas de cuatro cultivos hortícolas, regados con agua del Río Bogotá. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 2(2): 180-191.
- Mite, F.; Carillo, N. & Durango, W. (2010). Avances del monitoreo de presencia de cadmio en almadrás de cacao, suelos y aguas en Ecuador. XII Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo. Santa Domingo, Sociedad Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo.
- Navarro-Aviñó, J. P.; Aguilar, I. y López-Moya, J. R. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas* 16(2):10-25.
- Nessner, V. y Esposito, E. (2010). Biotechnological strategies applied to the decontamination of soil polluted with heavy metals. *Biotechnology advances*, 28:61-89.
- Nieboer, E. y Richardson, D. H. S., (1980). The replacement of the nondescript term "heavy metals" by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ. Pollut. Ser. B*, 1: 3-26.
- Obaji, A.; Romero, K.; Combatt, E.; Díaz, L.; Burgos, S.; Urango, I. y Marrugo, J. (2017). Evaluación de materiales como potenciales retenedores de metales pesados para su aplicación como enmiendas en suelos contaminados. Memorias III Seminario Internacional de Ciencias Ambientales SUE-Caribe. P. 209-211.
- OEFA. 2017. Plan Anual de Fiscalización Ambiental: Base legal. Consulta en línea (10/02/2020). Disponible en: http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2017/07/Res_182-2017-MINAM.pdf.
- OJEU (Official Journal European Union). (2014). Commission Regulation (EU) No 488/2014 of 12 May 2014 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of

- cadmium in foodstuffs Text with EEA relevance. The European Commission. Luxembourg.
- Paco, D. (2012). Evaluación de efectos de varios tipos de biochar en suelo y planta. Memoria del Proyecto fin de carrera Licenciatura en Ciencias Ambientales. Universidad autónoma de Barcelona. 110 p.
- Pérez Moncada, U. A.; Ramírez Gómez, M.; Serralde Ordoñez, D. P.; Peñaranda Rolón, A. M.; Wilches Ortiz, W. A.; Ramírez, L. y Rengifo Estrada, G. A. (2019). Hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) como estrategia para reducir la absorción de cadmio en plantas de cacao (*Theobroma cacao*). *Terra Latinoamericana* 37: 121-130. DOI: <https://doi.org/10.28940/terra.v37i2.479>.
- Pérez-García, P. E.; Azcona-Cruz, M. I. (2012). Los efectos del cadmio en la salud. *RevEspMédQuir* 17(3):199-205.
- Pernía, B., A. De Sousa, R. Reyes, y M. Castrillo. (2008). "Biomarcadores de contaminación por cadmio en las plantas". *Interciencia* 33 (2):112-119.
- Po, L.G.; Siddiq, M. & Shahzad, T. (2018). *Chili, peppers, and paprika*. En: Siddiq, M. & Uebersax, M.A. (eds). Handbook of vegetables and vegetable processing, volumen II, second edition. Cap 27. Wiley-Blackwell, Estados Unidos.
- Poschenrieder, CH., Gunse, B. y Barcelo, J. (1989). Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance, and abscisic acid content in expanding bean leaves. *Plant Physiol.*, 90: 136-371.
- Prieto Méndez, J., González Ramírez, C.A., Román Gutiérrez, A.D.; Prieto Pernía, B., A. De Sousa, R. Reyes, y M. Castrillo. (2008). "Biomarcadores de contaminación por cadmio en las plantas". *Interciencia* 33 (2):112-119.
- Prieto, J.; Gonzáles, C.; Román, A. y Prieto, F. (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelo y agua. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 10(1): 29-44.
- Rajendran P, Muthukrishnan J, Gunasekaran P. (2003). Microbes in heavy metal remediation. *Indian Journal of Experimental Biology*, 41: 935-944.
- Reeves, W.D.; Mask, P. L.; Wood, C. W. y Delay, D. P. (1993). Determination of wheat nitrogen status with a handheld chlorophyll meter. Influence of management practices. *J. Plant Nutr.* 16: 7781-7796.
- Rivera-Becerril, F., Calantzis, C., Turnau, K., Caussanel, J.P., Belimov, A.A., Gianinazzi, S., Strasser, R.J. y Gianinazzi-Pearson, V. (2002). Cadmium accumulation and buffering of cadmium-induced stress by arbuscular mycorrhiza in three *Pisum sativum* L., genotypes. *J. Exp Bot* 53: 1177-1185.
- Rivera-Becerril, F., Van Tuinen, D., Martin-Laurent, F., Metwally, A., Dietz, K.J. y Gianinazzi, S. (2005). Molecular changes in *Pisum sativum* L. roots during arbuscular mycorrhiza buffering of cadmium stress. *Mycorrhiza* 16: 51-60. 10.1007/s00572-005-0016-7.
- Rodríguez, M. N.; Alcántar, G.; Aguilar, A. Etchevers, J. D. y Santizó, J. A. (1998). Estimación de la concentración de nitrógeno y clorofila en tomate mediante un medidor portátil de clorofila. *Terra*, 16(2):135-141.
- Rodríguez, S.; Martínez, R.; Romero, P. y Sandalio, L. (2008). "Toxicidad del Cadmio en Plantas". *Ecosistemas* 17: 139-146.
- Rodríguez-Ortíz, J. C.; Valdez-Cepeda, R. D.; Lara-Mireles, J. L.; Rodríguez-Fuentes, H.; Vázquez-Alvarado, R. E.; Magallanes-Quintanar, R. y García Hernández, J. L. (2006). Soil nitrogen fertilization effects on phytoextraction of Cd and Pb by tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Bioremediation Journal* 10(3): 105-114.
- Rueda, G., Rodríguez, J., y Madriñán, R. (2011). Metodologías para establecer valores de agrícolas: Perspectivas para Colombia". *Acta Agronómica* 60(3):203-218.

- Say, R., Denizli, A. y Arica, M. Y. (2001). Biosorption of cadmium (II), lead (II) and copper (II) with filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresource Technology*, 76(1), 67-70.
- Shahabivand, S.; Maivan, H. Z.; Goltapeh, E. M.; Sharif, M. & Aliloo, A. A. (2012). The effects of root endophyte and arbuscular mycorrhizal fungi on growth and cadmium accumulation in wheat under cadmium toxicity. *Plant Physiol. Biochem.* 60:53-58. doi: 10.1016/j.plaphy.2012.07.018.
- Shaw, A. J. (Ed.), (1990). Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Skladany, G.J. y F.B. Metting Jr. (1993). Bioremediation of contaminated soil. pp. 483-513. In: Metting Jr., F.B. (ed.). Soil microbial ecology. Applications in agricultural and environmental management. Marcel Dekker. New York.
- Smith, S. y Gianinazzi-Pearson, V. (1988). Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39 221-244. 10.1146/annurev.pp.39.060188.001253.
- Sohi, S. Loez-Capel, E., Krull, E., Bol, R. (2009). "Biochar's roles in soil and climate change: A review of research needs". CSIRO Land and Water Science Report 05/09, 64pp.
- Stiborova, M.; Doubravova, M.; Brezinova, A. & Friedrich, A., (1986). Effect of heavy metal ions on growth and biochemical characteristics of photosynthesis of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Photosynthetica*, 20: 418-425.
- Stomp, A.M., K.H. Han, S. Wilbert, M. Gordon y S.D. Cunningham. (1994). Genetic strategies for enhancing phytoremediation. *Recombinant DNA Technology II*. Ann. New York Acad. Sci. 721: 481-491.
- Tantalean, E. y Huayua, M. A. (2017). Distribution of cadmium content in the different organs of cacao CCN-51 in alluvial and residual soils in the towns of Jacintillo and Ramal de Aspuzana. *Rev. de investig. agroproducción sustentable* 1(2): 69-78
- Taylor M.D. y Percivar, H.J. (2001). Cadmium in soil solutions from a transect of soils away from a fertilizer bin. *Environ Pollut.* 113(1): 35-40.
- The European Parliament and the Council of the European Union. (2014). Directive 2014/24/UE of the European Parliament and of the council. Official Journal of the European Union. Of 26 february, 2014. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014L0024&from=EN>.
- Van Assche, F. y Clijsters, H., (1990). Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.*, 13: 195-206.
- Van der Lelie, D.; Schwitzguébel, J.P.; Glass, D. J.; Vangronsveld, J. y Baker, A. (2001). Assessing phytoremediation's progress in the United States and Europe. *Environ. Sci. Technol.* 35: 446A-452A.
- Vangronsveld, J. y S.D. Cunningham. (1998). Metal contaminated soils. In situ inactivation and phytoremediation. R.G. Landes Company. Georgetown, TX.
- Vazquez, M. D., Poschenrieder, CH., Madico, J., Hatton, P., Baker, A. J. M. y Cope, G. H., (1992). Localization of zinc and cadmium in *Thlaspi caerulescens* (*Brassicaceae*), a metallophyte that can hyperaccumulate both metals. *J. Plant Physiol.* (en prensa).
- Vazquez, M. D.; Poschenrieder, CH. & Barcelo, J. (1989). Pulvinus structure and leaf abscission in cadmium-treated bean plants (*Phaseolus vulgaris*). *Can. J. Bot.*, 67: 2756-2764.
- Venegas, A. (2015). Evaluación de la adición de materiales de origen orgánico para la remediación de suelos contaminados con metales pesados. Doctorado en química analítica del medio ambiente. Universidad de Barcelona. Barcelona. Consultado (10/02/2020). Disponible en: <https://www.tesisenred.net/handle/10803/292729>.

- Villanueva, P. K. (2020). Relación entre las características del suelo y la concentración de cadmio en los tejidos de la planta de cacao (*Theobroma cacao L.*) en Pumahuasi, Huánuco. Tesis de pregrado de la Universidad Nacional Hermilio Valdizán. Disponible en: <http://repositorio.unheval.edu.pe/handle/UNHEVAL/5386>
- Volke-Sepúlveda, T., Velasco-Trejo, J. A., y De la Rosa-Pérez, D. A. (2005). Suelos contaminados por metales pesados y metaloides. México: INE-Semarnat.
- Wang, M.; Zhu, Y.; Cheng, L.; Anderson, B.; Zhao, X.; Wang, D. y Ding, A. (2018)._Review on utilization of biochar for metal-contaminated soil and sediment remediation. *Journal of Environmental Sciences* 63:156-173.
- Wood, C.W., Tracy, P. W.; Reeves, D. W. y Edmisted, K. L. (1992). Determination of cotton nitrogen status with a hand-held chlorophyll meter. *J. Plant Nutr.* 15: 1435-1448.
- Yadav, S.K. (2010). Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, 76: 167-179.
- Zimmer D, Baum C, Leinweber P, Hrynkiewicz K, Missner R. (2009). Associated bacteria increase the phytoextraction of cadmium and zinc from a metal-contaminated soil by mycorrhizal willows. *Int J Phytoremediat*, 11:200-213.



ISBN: 978-612-00-6133-6



9 786120 061336